

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

ENVIRONMENTÁLNE RIZIKÁ
ANTHELMINTÍK

Vedúca diplomovej práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D

Hradec Králové 2019

Bc. Nikoleta Dojčanská

Prehlásenie:

„Čestne prehlasujem , že uvedená diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom vypracovaná pod vedením prof. Ing. Barbory Szotákovej, Ph.D. Odborné literárne a iné informačné zdroje, z ktorých som čerpala pri vypracovaní diplomovej práce sú citované v zozname použitej literatúry.“

Nikoleta Dojčanská

Pod'akovanie:

Týmto by som sa rada poďakovala vedúcej práce prof. Ing. Barbory Szotákovej, Ph.D. za ochotný prístup, odborné rady, pomoc a spoluprácu pri vypracovaní diplomovej práce.

Taktiež by som rada poďakovala Ing. Vladimírovi Kubíčkovi, CSc. za pomoc a radu.

Výskum popísaný v tejto práci vznikol za finančnej podpory Grantovej agentúry Českej republiky (grant číslo GAČR 18-08452S).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Nikoleta Dojčanská

Školiteľ: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D

Názov diplomovej práce: Environmentálne riziká anthelmintík

Anthelmintiká sú liečivá využívané v humánnej a veterinárnej medicíne k terapii a profylaxii infekčných ochorení spôsobených parazitmi - helmintami. A sú nepochybne prospešné pre liečené organizmy. Avšak ich celkový účinok na ekosystém doteraz nebol dostatočne preskúmaný. Anthelmintiká sa spoločne s ich metabolitmi dostávajú do životného prostredia viacerými cestami. Jednou možnosťou je priamo prostredníctvom moču a exkrementov liečených hospodárskych zvierat alebo nepriamo presakovaním látok z kontaminovaného hnoj do povrchových a podzemných vôd. Takéto znečistenie má účinok na rozličné živočíšne organizmy a rastliny, ktoré majú schopnosť prijímať xenobiotiká a odstraňovať ich prostredníctvom metabolických dráh.

Cieľom tejto práce bolo skúmať vplyv anthelmintík ivermektínu a fenbendazolu na rastliny sóje fazuľovej (*Glycine max*). Zisťovali sme koncentráciu celkových fenolických látok spektrofotometricky pomocou metódy Folin-Ciocalteu. Pomocou kolorimetrickej metódy chloridu hlinitého sme zistili koncentráciu flavonoidov v rastlinách sóje fazuľovej. Stanovenie koncentrácie izoflavónov- genisteínu, daidzeínu a glyciteínu bolo prevedené pomocou HPLC metódy.

Zistili sme, že ivermektín aj fenbendazol ovplyvňujú koncentráciu fenolických látok, kedy pri vzorkách ovplyvnených ivermektínom aj fenbendazolom došlo k zníženiu obsahu fenolických látok. Pri účinku ivermektínu a fenbendazolu sa nedá jednoznačne potvrdiť, či celkový obsah flavonoidov znižujú alebo zvyšujú pretože, v niektorých častiach rastliny koncentráciu zvyšujú a v niektorých naopak koncentráciu flavonoidov znižujú. Pri meraní koncentrácie vybraných izoflavónov mala väčšina z nich koncentráciu pod hranicou detekcie, čiže nebolo možné posúdiť účinok ivermektínu a fenbendazolu na ich koncentráciu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Nikoleta Dojčanská

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D

Title of diploma thesis: Environmental risks of anthelmintics

Anthelmintics are drugs used in human and veterinary medicine for the treatment and prophylaxis of infectious diseases caused by parasites- helminths. They are admittedly beneficial to the treated organisms. However, their overall effect on the ecosystem has not yet been sufficiently explored. Anthelmintics, together with their metabolites, enter the environment in multiple ways. One possibility is directly through urine and excrements of treated livestock or indirectly by leakage of contaminated manure into surface and groundwater. Such pollution has an effect on various animal organisms and plants that have the ability to uptake xenobiotics and remove them through metabolic pathways.

The aim of this work was to investigate the effect of antihelmintics ivermectin and fenbendazole on soybean plants (*Glycine max*). We investigated the concentration of total phenolic compounds spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method. Using the colorimetric method of aluminum chloride, we found the concentration of flavonoids in soybean plants. The concentration of isoflavons- genistein, daidzein, and glycitein was determined by HPLC method.

We found that both ivermectin and fenbendazole affect the concentration of phenolic compounds, when both the fenbendazole-treated and ivermectin-treated samples showed decreased phenol content. The effect of ivermectin and fenbendazole on total flavonoid content cannot be unequivocally confirmed. The content of flavonoids was decreased in some parts of the plant and increased in others. The concentration of selected isoflavones was measured using HPLC, but most of them was below the detection limit, so it was not possible to assess the effect of ivermectin and fenbendazole on their concentration.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1. Životné prostredie a kontaminanty	9
2.1.1. Veterinárne lieky a životné prostredie	10
2.2. Anthelmintiká.....	11
2.2.2. Fenbendazol	12
2.2.3. Ivermektín	13
2.3. Fytoremediácia	14
2.3.1. Fytoremediačné techniky	15
2.3.2. Znečistenie životného prostredia	19
2.4. <i>Glycine max</i> (Sója fazuľová).....	20
2.5. Fenoly	21
2.5.1. Flavonoidy.....	23
2.5.1.1 Genistein	27
2.5.1.2. Daidzein	29
2.5.1.3. Glycitein.....	31
2.6. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.....	32
2.6.1. Detekčné systémy	34
2.6.1.1. Detektor fotodiódového poľa	34
2.6.1.2. Fluorescenčný detektor	35
3. CIEĽ PRÁCE	36
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	37
4.1. Materiál, pomôcky, prístroje	37
4.1.1. Chemikálie	37
4.1.2. Biologický materiál	37
4.1.3. Pomôcky.....	37
4.1.4. Prístroje	37
5. METODIKA PRÁCE	38
5.1. Pestovanie rastlín a ovplyvnenie anthelmintikami	38
5.2. Príprava vzorky	39
5.3. Stanovenie celkového obsahu fenolov.....	39
5.4. Stanovenie obsahu flavonoidov	41

5.5. Stanovenie koncentrácie izoflavónov	42
6. VÝSLEDKY	45
6.1. Koncentrácia celkových fenolov	45
6.2. Koncentrácia celkových flavonoidov	51
6.3. Koncentrácia izoflavónov	55
7. DISKUSIA	59
8. ZÁVER	64
9. ZOZNAM SKRATIEK	65
10. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	66

1. ÚVOD

V súčasnosti veľmi závažným problémom je neustále sa zvyšujúce riziko znečisťovania životného prostredia z dôvodu pribúdajúcich nových kontaminantov. Jedným z možných kontaminantov sú aj veterinárne anthelmintiká. Medzi najčastejšie používané patria anthelmintiká so širokým spektrom účinku zo skupín benzimidazolov (napr. alben-dazol, flubendazol, fenbendazol) alebo avermektínov (napr. ivermektín). Vo väčšine prípadov ide o kontaminanty dostávajúce sa do životného prostredia prostredníctvom exkrementov a moču hospodárskych zvierat, alebo presakujúc z kontaminovaného hnoja do povrchových a podzemných vôd. Anthelmintiká majú negatívny účinok na rôzne necieľové organizmy: bezstavovce, vodné živočíchy, ale aj rastliny. Rastliny čerpajú zvyškové liečivá z kontaminovaných vôd a pôd, absorbujú ich, metabolizujú a akumulujú vo svojich častiach, kde môžu ovplyvňovať látky nachádzajúce sa prirodzene v rastlinách. Hoci majú dlhodobu nepriaznivý vplyv na životné prostredie, nie sú regulované (Garcia-Rodríguez et al. 2014; Bártíková et al. 2015).

V našej práci sme pracovali s rastlinou sóje fazuľovej (*Glycine max*). O tú je v súčasnosti zvýšený záujem, pretože sa zistilo, že okrem podpory zdravia má aj terapeutický účinok prostredníctvom niektorých obsahových látok, napr. izoflavóny majú silnú antioxidačnú aktivitu. Táto práca sa zabývala vplyvom anthelmintík ivermektínu a fenbendazolu na koncentráciu fenolických látok, flavonoidov a vybraných izoflavónov v rastline sóje fazuľovej (*Glycine max*).

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Životné prostredie a kontaminanty

Kontaminanty sa do životného prostredia dostávajú už niekoľko storočí, ale významnými sa stali až po priemyselnej revolúcii v 19. storočí. Znečistenie životného prostredia nastáva vtedy, keď prostredie nedokáže odstrániť alebo zničiť znečisťujúci prvok bez toho aby si spôsobilo poškodenie. Znečisťujúce prvky zväčša nie sú tvorené prírodou a proces ich odstránenia môže trvať niekoľko dní až rokov (Lehman a Geller 2004).

Znečistenie životného prostredia, čiže kontaminácia vody, ovzdušia a pôdy je najväčšou príčinou chorôb a úmrtí v rozvojových krajinách. WHO odhaduje, že ročne zomiera na ochorenia spôsobené znečistením 8,9 milióna ľudí (Lehman a Geller 2004).

Toxické chemikálie sú celosvetovo čoraz dôležitejšími príčinami znečistenia. Za posledných 50 rokov bolo vynájdených tisíce nových chemikálii. Používajú sa v širokom spektre priemyselných odvetví a ako odpadové látky spôsobujú znečistenie (Lehman a Geller 2004; Shafi 2005).

Medzi hlavné typy znečistenia patrí znečistenie vzduchu, znečistenie vody a kontaminácia pôdy. Pri znečistení vzduchu dochádza k vypúšťaniu chemikálii- kontaminantov do ovzdušia, napríklad pri spaľovaní fosílnych palív akými sú ropa a uhlie, prostredníctvom ktorého sa do ovzdušia dostávajú oxid uhličitý, dusík, oxid uhoľnatý, oxidy sýry a ďalšie častice. Okrem toho sa do vzduchu dostávajú ako kontaminanty ozón, prchavé organické zlúčeniny a rozptýlené častice. K znečisteniu vody dochádza povrchovým odtokom a presakovaním rôznych kvapalných a pevných kontaminantov. Minerálne a organické odpady rôzneho druhu a tiež vedľajšie priemyselné produkty a odpady sa dostávajú do jazier, riek a morí. Okrem toho sa do vody dostávajú aj anorganické látky ako sú ortuť, olovo, meď, zinok a podobne. Taktiež poľnohospodárske dusíkaté a fosfátové hnojivá sa dostávajú do vody, kde subletálne až letálne pôsobia na malé živé organizmy. Kontaminácia pôdy je najčastejšie spôsobená uhl'ovodíkmi, ťažkými kovmi, herbicídmi, pesticídmi, rozpúšťadlami a chlórovanými uhl'ovodíkmi. Medzi hlavných producentov kontaminantov patria priemysel, ľudské sídla a dopravné prostriedky (Lehman a Geller 2004; Shafi 2005).

Znečistenie už môže byť v súčasnosti kontrolované. Vyspelé krajiny identifikovali a začali kontrolovať mnohé zo svojich najhorších problémov znečisťovania životného prostredia. Vypracovali uskutočniteľné, nákladovo efektívne a opakovateľné stratégie,

vd'aka ktorým sa znižuje množstvo kontaminantov v prírode (Lehman a Geller 2004; Shafi 2005).

2.1.1. Veterinárne lieky a životné prostredie

Farmaceutika sa zaraďujú do skupiny neregulovaných kontaminantov, ktoré majú dlhodobý nepriaznivý účinok na ekosystém a súčasne sú najčastejšie detekované antropogénne kontaminanty v životnom prostredí (Bártíková et al. 2015).

Veterinárne liečivá sú potenciálnou skupinou chemických kontaminantov, pretože sú navrhnuté tak aby, mali biologické účinky aj v nízkych koncentráciách. Okrem základnej formy chemickej látky, t.j. aktívnej zlúčeniny alebo proliečiva (neaktívny prekurzor, ktorý sa konvertuje na aktívnu formu normálnymi metabolickými procesmi), sa do životného prostredia dostávajú aj ich bioaktívne metabolity a transformačné produkty (Bártíková et al. 2016).

Farmakologicky účinné látky, ktoré sú súčasťou veterinárnych liekov, predstavujú dôležitý spôsob, ako liečiť a predchádzať chorobám zvierat. Okrem liečiv sa do stravy hospodárskych zvierat často pridávajú aj iné chemikálie ako sú potravinové doplnky alebo rastové hormóny. Aj keď sú zdravotné prínosy liekov pre cieľové druhy obzvlášť dôležité, liečivá vstupujú do prostredia, kde môžu pôsobiť negatívne na mnohé ďalšie druhy. Tieto riziká pre životné prostredie sa zvýšili, pretože stále viac a viac liečiv sa používa na liečbu a profylaxiu zvierat v dôsledku zvýšených nárokov na poľnohospodárstvo a akvakultúru (Boxall et al. 2003; Kümmerer 2009).

Veterinárne liečivá sa môžu do životného prostredia dostať viacerými cestami. Medzi najčastejšou príčinou je znečistenie emisiami počas výroby alebo pri odstraňovaní nepoužitých liečiv. Najdôležitejšou cestou vstupu farmaceutík do životného prostredia je cez moč a fekálie liečených hospodárskych zvierat a následne hnojením takýmto trusom alebo zavlažovaním kontaminovanou vodou. Po uvoľnení do životného prostredia sa parentálne zlúčeniny a ich degradačné produkty ľahko dostávajú do ovzdušia, vody a pôdy (Boxall et al. 2003). Odtiaľ sú veterinárne lieky schopné narušiť vodný a suchozemský ekosystém. Zvyškové veterinárne liečivá sa v životnom prostredí môžu absorbovať a akumulovať v rastlinách, ktoré si ich prevzali z povrchovej vody, aby splnili svoje evapotranspiračné a fotosyntetické požiadavky. Prijem liečiva a jeho akumulácia sa odlišuje podľa druhov rastlín a štruktúry farmaceutických výrobkov (Bártíková et al. 2015).

Veterinárne liečivá, tak ako aj ostatné environmentálne kontaminanty vstupujú do rastlín a predstavujú pre rastliny možné riziko. Biologická aktivita a toxicita lieku sa môže zachovať v rastlinách a existuje určité riziko, že konzumácia rastlín obsahujúcich lieky alebo kontakt s takto znečistenou pôdou, by mohla ovplyvniť bezstavovce alebo iné zvieratá. Voľne žijúce helminty spolu s inými bezstavovcami patria medzi najohrozenejšie skupiny organizmov, ktoré sú ohrozené kontaktom s kontaminovanou pôdou, hnojom, vodou. Okrem toho expozícia nižších vývojových štádií parazitných helmintov na nízke koncentrácie anthelmintík v pôde a následne v rastlinách môže viesť k vzniku a vývoju rezistentných kmeňov hlíst voči daným anthelmintikám. Taktiež aj človek môže byť vystavený nežiaducej expozícii veterinárnym liečivom najčastejšie buď konzumáciou liečených zvierat alebo ich produktov (Stuchlíková et al. 2016; Bártíková et al. 2015; Laurent et al. 2007; Boxall et al. 2003).

Anthelmintiká, ktoré vstúpili do rastlinných buniek, sa môžu metabolizovať prostredníctvom pôsobenia biotransformačných enzýmov. Biotransformácia liekov v rastlinách nastáva v dvoch fázach. V prvej fáze biotransformácie dochádza k oxidácii, redukcii alebo hydrolýze liekov. Vo fáze II sa môžu liečivá alebo ich metabolity fázy I zúčastniť konjugačných reakcií s endogénnymi zlúčeninami, napr. glutatión, glukóza, aminokyseliny. Takto biotransformované metabolity sú uložené vo vakuolách alebo v bunkových stenách (Kumar et al. 2012; Stuchlíková et al. 2016).

V skutočnosti iba biotransformácia liekov na netoxické a stabilné metabolity a ich následná akumulácia v rastlinách predstavujú možné spôsoby detoxikácie liečiva. Je však potrebné mať na pamäti, že niektoré liekové metabolity môžu byť ešte toxickéjšie ako pôvodná zlúčenina (Stuchlíková et al. 2016).

2.2. Anthelmintiká

Anthelmintikum je liek, ktorý sa používa na liečbu infekcií spôsobených parazitickými červami- helmintami alebo ich infekčnými štádiami, ktoré majú závažný vplyv na zdravie ľudí a zvierat, a zapríčiňujú značné zdravotné problémy a hospodárske straty (Holden-Dye a Walker 2014).

Anthelminitká sú vo veľkom množstve používané najmä vo veterinárnom lekárstve na liečbu rozličných helmintóz. Navyše sú často využívané k profylaxii, čo signifikantne zvyšuje svetovú spotrebu liečiv. Anthelminitká pôsobia na červy v intestinálnom trakte

ale aj v iných orgánoch (pľúca, pečeň, obličky a pod.) buď usmrtením alebo ich paralyzujú a zabraňujú ich prichyteniu k stene tenkého čreva. Následne sú eliminované z organizmu cez stolicu (Turkington a Ashby 2007; Stuchlíková et al. 2016).

Helminti sa z hľadiska veterinárnej medicíny rozdeľujú na ploché červy Trematoda-motolice a Cestoda- pásomnice, a oblé červy Nematoda -hlístovce. Dospelé červy sú zväčša endoparaziti, parazitujúci najčastejšie v tenkom čreve, ale aj v iných orgánoch (pľúca, pečeň). Telo motolíc je dorzoventrálne sploštené, listovité alebo kopijovité a obsahuje dve prísavky. Ich vývojový cyklus je nepriamy, najčastejšie cez plža. Dospelý jedinci motolíc napádajú najmä časti tráviacej rúry, ale môžu byť aj v pľúcach, pečeni, obličkách alebo v žlčníku. Pásomnice sú hermafroditi s dorzoventrálne splošteným telom a so štyrmi prísavkami. Majú nepriamy vývin, zväčša s dvomi medzihostiteľmi a napádajú črevnú sliznicu alebo tkanivá. Hlístovce sú gonochoristi s tenkým nečlankovitým telom, ktoré je bilaterálne súmerné. Taktiež môžu parazitovať v tráviacom trakte alebo napádajú tkanivá (Votava 2006; Holden-Dye a Walker 2014).

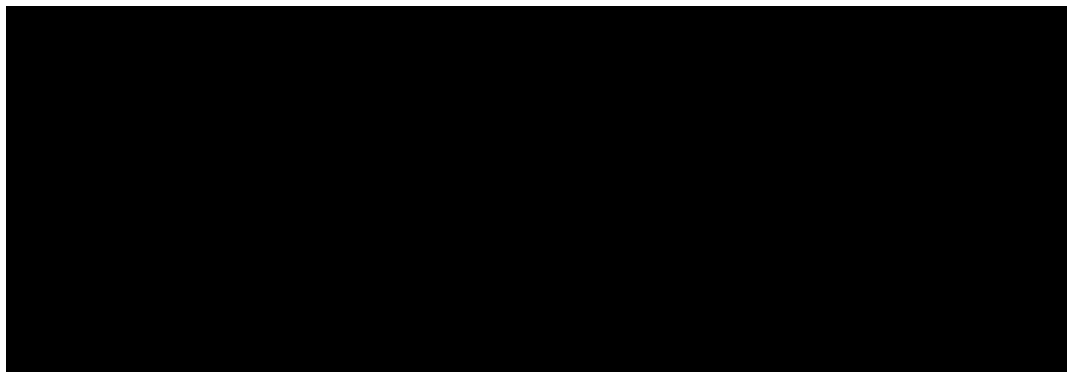
Anthelmintiká sa rozdeľujú z hľadiska ich účinku voči jednotlivým triedam na antitreumatodika, anticestodika a antinematodika. Na základe ich molekulárnej štruktúry a mechanizmu pôsobenia sa delia na benzimidazoly, makrocyclické laktóny, tetrahydropyrimidiny, imidazothiazoly, salicylanilidy, hexahydropyraziny, difenylsulfidy a ostatné (Votava 2006; Lamka a Ducháček 2014).

2.2.2. Fenbendazol

Fenbendazol (FEN) (Obr.1) je liečivo patriace do skupiny benzimidazolov, pôsobiace proti pásomniciam, hlístovcom i motoliciam. Využíva sa pri liečbe parazitárnych ochorení tráviaceho traktu, pľúc, popríklad orgánov alebo tkanív prasiat, kráv, koní, oviec, mačiek, psov. Inhibuje polymerizáciu štrukturálneho proteínu β -tubulínu vo vnútri nervových axónov a nenávratne inhibuje fumarát reduktázu a transport glukózy, čím dochádza k úmrtiu parazita. Pri perorálnom podaní sa nevstrebáva celé liečivo. Približne 40 % nezmenenej látky a časť metabolitov sa vylučuje hlavne stolicou, približne 10% aj močom (Grønvold et al. 2004; Lamka a Ducháček 2014).

Takto uvoľnené liečivá môžu byť prijímané do rastlín, kde majú toxické účinky alebo sa akumulujú v rastlinných tkanivách, čím dochádza k následnej expozícii ľudí a zvierat prostredníctvom konzumácie takýchto rastlín. V rastlinách sa fenbendazol metabolizuje

pomocou biotransformačných enzýmov v dvoch fázach. V prvej fáze dochádza k oxidácii, hydroxylácii alebo hydrolýze. Metabolity fenbendazolu z prvej fáze biotransformácie sú konjugované s UDP- glukózou. V druhej fáze je fenbendazol glukozidovaný a následne acetylovaný. Počas metabolizovania fenbendazolu v rastlinách môže vzniknúť až 29 metabolitov. Všeobecne platí, že parentná látka a metabolit majú rozdielne fyzikálno-chemické vlastnosti, čo vedie k ich odlišnej biologickej aktivite a rozdielnemu správaniu sa v rastlinách (Bártíková et al. 2016; Stuchlíková et al. 2016).



Obr. 1 Fenbendazol (wikipeda.org)

2.2.3. Ivermektín

Ivermektín (IVM) je liečivo, ktoré sa zaraďuje medzi makrocyclické laktóny do skupiny avermektínov. Je to biosyntetické liečivo, získavané fermentačným procesom z pôdnej aktinomycéty *Streptomyces avermitilis*. Používa sa pri liečení endoparazitárnych nematodóz v črevách a pľúcach, spôsobených vývojovými štádiami aj dospelými jedincami u kôz, oviec, prasiat, kráv, koní. Používa sa aj ako antiektoparazitikum, pretože pôsobí taktiež proti hmyzu a roztočom. Má reziduálny účinok, čo znamená, že okrem odstránenia vyskytujúceho sa ochorenia na určitý čas pôsobí aj ako ochrana voči opakujúcim sa ochoreniam. Pôsobí na funkciu chloridových kanálov, dochádza tak k poruche prenosu nervového vzruchu, následkom čoho dochádza k inhibícii elektrického potenciálu v nervových bunkách červov. Dochádza k úmrtiu, paralýze alebo k inhibícii reprodukcie u parazita. Viac ako polovica podaného liečiva sa vylučuje stolicou v parentnej forme (Lamka a Ducháček 2014; Ducháček a Lamka 2014; Grønvold et al. 2004).

Metabolizmus v rastlinách prebieha prostredníctvom N- demetylácie, N- formylácie a konjugácie (Nollet a Rathore 2015).

2.3. Fytoremediácia

Zlepšenie a zvyšovanie produkcie v priemysle, poľnohospodárstve a likvidácii odpadu viedlo k vysokej kontaminácii vody a pôdy organickými zlúčeninami a ťažkými kovmi s negatívnym dopadom na ekosystémy a ľudské zdravie (Furini et al. 2015).

Použitie biologických systémov– mikroorganizmov, rastlín, enzýmov na odstránenie alebo degradáciu polutantov (znečisťujúcich látok) z kontaminovaného prostredia sa nazýva bioremediácia (Germaine et al. 2014) .

Fytoremediácia je sľubná nová technológia, ktorá využíva rastliny na degradáciu, asimiláciu, metabolizáciu alebo detoxikáciu kovov, pesticídov, uhlíkovodíkov, výbušnín, liečiv, chlórovaných rozpúšťadiel a iných polutantov nachádzajúcich sa v pôde, sedimentoch, podzemnej vody, povrchovej vode a dokonca aj v atmosfére. Vyznačuje sa využívaním vegetatívnych druhov rastlín na *in situ* ošetrovanie pôdy znečistenej rôznymi nebezpečnými látkami. Rastliny podporujú rôznymi procesmi sanáciu širokého spektra chemikálií na miestach s toxickým odpadom. Tieto procesy sú:

- zmena fyzikálnych a chemických vlastností kontaminovaných miest
- uvoľňovanie koreňových exsudátov, čím sa zvyšuje organický uhlík
- zlepšenie prevzdušňovania uvoľnením kyslíka priamo do koreňovej zóny, čím sa zároveň zvyšuje pórovitosť horných pôdnych vrstiev
- zachytávanie a spomaľovanie pohybu chemikálií
- uskutočňovanie kometabolických mikrobiálnych a rastlinných enzymatických transformácií chemických látok
- znižovanie migrácie znečisťujúcich látok do podzemnej vody odoberaním dostupnej vody a obrátením hydraulického gradientu (Susarla a Medina 2002; Paz-Alberto a Sigua 2013).

Fytoremediácia je ekologická a nákladovo efektívna alternatíva k súčasným technológiám sanácie (Lee 2013). Fytoremediácia sa môže uskutočňovať s použitím hyperakumulátorov, ktoré akumulujú 50-100-krát viac polutantov ako normálne rastliny. Ide o rastliny, ktoré absorbujú vysoké hladiny kontaminantov pomocou ich koreňov. Vo všeobecnosti sa rastliny zúčastňujú na vychytávaní, translokácii, sekvestracii a degradácii znečisťujúcich látok. Následne sú rastliny zozbierané a usušené, spopolnené alebo skompostované. Hyperakumulátory by mali mať schopnosť hromadiť vysoké koncentrácie kontaminantov, rýchly rast, vysoká produkcia biomasy, a mali by byť odolné voči choro-

bám a škodcom. V súčasnosti je identifikovaných viac ako 400 druhov hyperakumulátorov. Často využívanými hyperakumulátormi sú napríklad rastliny *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Trifolium pratense* a veľa iných. Okrem hyperakumulátorov je možné použiť rastliny, ktoré spĺňajú tieto podmienky: sú schopné prijímať kontaminanty do svojich koreňov; viazať tieto kontaminanty na koreňové tkanivo, fyzicky alebo chemicky; transportovať kontaminanty z koreňov do nadzemných častí rastliny; a zabrániť kontaminantom uniknúť z pôdy (Lee 2013; Paz-Alberto a Sigua 2013).

Fytoremediácia má niekoľko výhod medzi ktoré patrí najmä to, že ide o esteticky príjemnú a ekologicky pozitívnu technológiu, ktorá je zároveň aj lacná. Dochádza len k minimálnemu poškodeniu životného prostredia, je zlučiteľná s inými klasickými dekontaminačnými metódami a vzniká menej sekundárneho odpadu. Na druhej strane má fytoremediácia niekoľko obmedzení a nevýhod. Najefektívnejšia je iba na miestach s hĺbkou kontaminovanej pôdy/ vody menej ako 5m. Ide o časovo náročný proces, ktorý je vo veľkej miere ovplyvňovaný klimatickými a sezónnymi podmienkami (ovplyvňujú rast rastlín). Prežitie rastlín je ovplyvnené toxicitou kontaminantov a rastliny, ktoré absorbujú polutanty predstavujú potencionálne riziko prenosu týchto polutantov do potravinového reťazca (Lee 2013).

2.3.1. Fytoremediačné techniky

V súčasnosti existuje niekoľko spôsobov, ktorými rastliny čistia znečistené prostredie od kontaminantov. Mechanizmus a účinnosť fytoremediačných techník závisí od typu kontaminantu, biodostupnosti a vlastností pôdy. Aj napriek tomu, že medzi niektorými z týchto mechanizmov možno pozorovať prekrývanie alebo podobnosti každý z nich má iný vplyv na objem, toxicitu alebo pohyblivosť polutantov (Ahalya a Ramachandra 2006; Paz-Alberto a Sigua 2013).

Príjem kontaminantov v rastlinách prebieha primárne prostredníctvom koreňového systému. Koreňový systém poskytuje obrovskú plochu, ktorá vstrebáva a hromadí vodu a živiny nevyhnuté pre rast, spolu s ďalšími kontaminantmi. Rastlinné korene spôsobujú zmenu v rozhraní pôda– koreň, pretože uvoľňujú organické a anorganické exudáty v rizosfére. Tieto exudáty ovplyvňujú aktivitu a počet mikroorganizmov, stabilitu a agregáciu pôdných častíc okolo koreňa a dostupnosť kontaminantov. Prostredníctvom zmien v charakteristike pôdy, uvoľňovaní organických látok, zmien v chemickom zložení alebo zvýšení mikrobiálnej aktivity podporovanej rastlinami môžu koreňové exudáty zvýšiť

alebo znížiť dostupnosť kontaminantov v koreňovej zóne rastlín (Ahalya a Ramachandra 2006; Paz-Alberto a Sigua 2013; Etim 2012).

Fytoextrakcia

Fytoextrakcia, nazýva sa taktiež fytoakumulácia, je metóda, ktorá sa spolieha na prirodzenú schopnosť rastliny prijímať určité látky z prostredia a izolovať ich do buniek, až pokiaľ nebude rastlina zozbieraná. Fytoextrakcia sa používa predovšetkým na úpravu kontaminovaných pôd (Paz-Alberto a Sigua 2013; Etim 2012).

Ide o metódu, pri ktorej dochádza k vychytávaniu a premiestneniu kontaminantov z pôdy koreňmi rastlín do jej nadzemných častí (stonka, list, výhonky). V prípade fytoextrakcie sa využívajú najmä hyperakumulátory, ktoré sú schopné adsorbovať až 100-krát väčšie množstvá kontaminantov ako bežná rastlina. Nevýhodou je potrebná prítomnosť určitého mechanizmu na detoxikáciu alebo toleranciu vysokých koncentrácií kontaminantov vo výhonkoch rastliny. Rastliny sa vyberú a vysadia na konkrétne miesto na základe prítomných kontaminantov a podmienok na danom mieste. Tento postup sa v prípade potreby opakuje až pokiaľ sa hladiny kontaminantov neznížia na povolené limity. Rastliny sa po zbere spaľujú a nakladá sa s nimi ako s nebezpečným odpadom alebo sa kompostujú v prípade recyklácie kontaminantov, napr. kovov (Etim 2012; Susarla a Medina 2002; Ahalya a Ramachandra 2006).

Fytostabilizácia

Fytostabilizácia používa určité druhy rastlín na imobilizáciu kontaminantov v pôde prostredníctvom koreňovej absorpcie a akumulácie, adsorpcie koreňov alebo precipitácie v koreňovej zóne a fyzickej stabilizácie pôdy. Tento proces znižuje mobilitu kontaminantov a zabráňuje ich migrácii do podzemných vôd alebo do ovzdušia. Nazýva sa taktiež ako inaktivácia na mieste. Táto metóda je vhodná na ošetrovanie veľkých plôch vystavených povrchovej kontaminácii. Používa sa na finálnu úpravu plôch, kde boli použité iné sannačné metódy na odstránenie znečistenia (Etim 2012; Ahalya a Ramachandra 2006).

Pri použití fytostabilizácie sú nevyhnutné fyzikálne a chemické analýzy, biologické testy a pokusy v teréne. Výhodami tejto metódy sú jej efektívnosť pri rýchlej imobilizácii povrchových a podzemných vôd. Taktiež sa nevyžaduje likvidácia rastlín ako nebezpečného odpadu a zároveň znižuje eróziu pôdy a znižuje množstvo vody v systéme. Medzi hlavné nevýhody patrí kontaminant zostávajúci v pôde (Etim 2012).

Rastliny vhodné na použitie pri fytostabilizácii musia mať toleranciu voči vysokým hladinám kontaminantu; produkovať veľké množstvo koreňovej biomasy, ktorá je schopná imobilizácie prostredníctvom príjmu, precipitácie alebo redukcie; udržiavať kontaminanty v koreňoch, aby sa zabránilo ich prenosu do výhonkov (Padmavathiamma a Li 2007).

Fytovolatilizácia

Fytovolatilizácia je metóda, pri ktorej rastliny extrahujú znečisťujúce látky z pôdy a potom ich transformujú na prchavé látky a uvoľňuje ich do atmosféry (Paz-Alberto a Sigua 2013). Okrem toho zahŕňa aj kontaminanty, ktoré sa dostali do tela rastliny, odkiaľ sú transpirované vo forme prchavých látok z listov cez prieduchy. Môže tiež spôsobiť difúziu kontaminantov zo stoniek alebo iných častí rastlín pred dosiahnutím listov. Používa sa pri čistení kontaminantov z vody, pôdy a zo sedimentu (Etim 2012). Metóda sa najčastejšie aplikuje na odstránenie prchavých organických zlúčenín ako sú napríklad étery, ropné látky, ale aj na odstránenie selénu, arzénu, antimónu alebo ortuti (Padmavathiamma a Li 2007).

Použitie tejto metódy je však rozporuplné, pretože nedochádza k odstráneniu kontaminantov zo životného prostredia, ale len k jeho presunu z pôdy do atmosféry (Soudek et al. 2008).

Fytodegradácia

Fytodegradácia je metóda, kedy rastliny absorbujú, transformujú a odbúravajú organické polutanty. Tento proces zahŕňa degradáciu komplexných molekúl na jednoduché molekuly alebo začlenenie týchto molekúl do rastlinných tkanív. Za fytodegradačný proces môžeme považovať aj uvoľňovanie enzymatických metabolitov rastliny do pôdy, čo vedie k znižovaniu kontaminantov. Prijímanie molekúl je podmienené rozpustnosťou a hydrofóbnosťou kontaminantov. Využíva sa pri čistení pôd, sedimentu alebo podzemných vôd (Etim 2012; Soudek et al. 2008).

Pri fytodegradácii je potrebné zabrániť premene na toxickéjšie metabolity ako je samostatný polutant (Soudek et al. 2008).

Rizofiltrácia

Rizofiltrácia je metóda, ktorá sa využíva na odstránenie kontaminantov z povrchových, splaškových alebo podzemných vôd s nízkou koncentráciou kontaminantov. Využíva sa koreňový systém rastlín, pričom dochádza k precipitácii kontaminantov v koreňovom systéme alebo k absorpcii priamo v koreňoch rastliny. Využíva sa najmä na odstraňovanie kovov alebo organických zlúčenín (Paz-Alberto a Sigua 2013; Ahalya a Ramachandra 2006).

Princíp metódy je podobný fytoextrakcii, ale rastliny sa používajú predovšetkým na riešenie problému kontaminovanej podzemnej vody a nie na pôdu. Rastliny používané na rizofiltráciu nie sú vysadené priamo in situ, ale sú najskôr aklimatizované so znečisťujúcou látkou. Pokým sa vyvinie veľký koreňový systém, rastliny sa hydroponicky pestujú v skleníku, pričom ich korene sa nachádzajú vo vode a nie v pôde. Keď sa u rastlín vyvinie veľký koreňový systém zásobovanie čistou vodou sa nahradí prívodom znečistenej vody, aby sa rastliny aklimatizovali. Rastliny sa následne vysadia v kontaminovanej oblasti, kde cez korene prijímajú vodu a spoločne s ňou aj kontaminanty. Po nasýtení koreňov kontaminantmi, sú zozbierané a bezpečne zlikvidované buď spálením alebo sa kompostujú kvôli následnej recyklácii kontaminantov (Paz-Alberto a Sigua 2013; Ahalya a Ramachandra 2006).

Pri rizofiltrácii sa uprednostňujú suchozemské rastliny, pretože majú vláknitý a oveľa dlhší koreňový systém, čím sa zvyšuje množstvo koreňovej plochy. Výhodou rizofiltrácie je schopnosť využívať suchozemské a vodné rastliny na aplikácie in situ alebo ex situ. Pri rizofiltrácii kontaminanty nemusia byť prenesené z koreňov na výhonky, vďaka čomu sa nemusia používať hyperakumulátory, čo je ďalšou výhodou. Nevýhodou je hlavne potreba pestovania rastlín v skleníku, kde je neustála potreba úpravy pH (Etim 2012).

Rizodegradácia

Táto metóda sa tiež označuje ako fytostimulácia. Je to proces pri ktorom dochádza k rozpadu kontaminantov v oblasti koreňovej zóny alebo v rizosfére zvýšením množstva mikroorganizmov. Rastliny do pôdy uvoľňujú organické zlúčeniny, ako sú cukry, alkoholy. Korene taktiež poskytujú dostatočnú povrchovú plochu pre rast mikroorganizmov a zabezpečujú prenos kyslíka z prostredia. Tieto látky stimulujú rast mikroorganizmov

v pôde, dochádza k stimulácii ich aktivity, v dôsledku čoho dochádza k odbúraniu polutantov v okolí. Využíva sa najmä pri odstraňovaní polycyklických aromatických uhlíkov, pesticídov, chlorovaných rozpúšťadiel, benzénu a pod (Soudek et al. 2008; Etim 2012).

2.3.2. Znečistenie životného prostredia

Do životného prostredia sa v súčasnosti dostávajú kontinuálne zmesi liekov v globálnom meradle. Najväčším zdrojom je humánna a veterinárna medicína, kde sa lieky využívajú okrem liečby aj na prevenciu rozličných chorôb, ale aj ako stimulatory rastu a s rozsiahlym využitím v poľnohospodárstve. Liečivá majú rôzne fyzikálno-chemické a biologické vlastnosti, s odlišnými spôsobmi biochemického pôsobenia. Po podaní sa niektoré liečivá ďalej metabolizujú, iné zostávajú nezmenené. Podľa zistení OECD z roku 2014 je dokázané, že používanie a spotreba farmaceutických výrobkov sa za posledných štrnásť rokov zdvojnásobila alebo takmer strojnásobila (Boxall et al. 2003).

Anthelmintiká sa do životného prostredia môžu dostať priamou cestou prostredníctvom moču a výkalov alebo nepriamou cestou, čo je prostredníctvom likvidácie nepoužitých alebo zvyšných liekov do kanalizácie. Anthelmintiká sa z pôdy dostávajú do koreňov, listov rastlín a ovplyvňujú rastlinné tkanivá. Aby sa zabránilo toxickému účinku, t.j. poškodeniu buniek a tkanív, rastliny ich musia metabolizovať na netoxické formy a zároveň ich izolovať od bežných metabolických procesov. Tieto procesy sú podobné s detoxikáciou u živočíchov v pečeni, avšak chýba im vylučovacia cesta. Metabolity sa preto ukladajú v rastlinných tkanivách, vakuolách alebo v bunkových stenách (Klaassen 2013).

Tieto procesy môžu byť rozdelené do troch fáz: fáza I- transformácia, fáza II- konjugácia a fáza III- kompartmentácia. V prvej fáze sa liečivá modifikujú tak, aby sa pripravili na ďalšie fázy. Aktivujú sa oxidačnými, redukčnými alebo hydrolytickými reakciami, ktoré umožňujú ďalšie konverzie. V druhej fáze sa aktivované zlúčeniny konjugujú s glykozidmi, glutatiónom alebo aminokyselinami. Hlavnými znakmi týchto konjugátov sú znížená biologická aktivita, znížená toxicita, zvýšená rozpustnosť vo vode a znížená pohyblivosť. Hlavné procesy v reakciách tretej fázy sú ďalšia konjugácia, sekvestrácia metabolitov do vakuoly na skladovanie a viazanie metabolitov do bunkovej steny (Klaassen 2013).

Účinky liečiv v rastlinách spôsobujú biochemické a fyziologické narušenia, ktoré sú založené na interakcii s makromolekulárnymi alebo bunkovými cieľmi, ale zároveň spôsobujú aj narušenie signálnych ciest. Môžu indukovať zmeny na úrovni génovej expresie, regulácie a prenosu signálu. Rozvoj transkriptomiky a proteomiky odhalil, že dôležitými mechanizmami reakcie rastlín na liečivá sú modifikácie génov. (Bártíková et al. 2016)

Podľa zistení (Stuchlíková et al. 2018) majú anthelmintiká flubendazol a fenbendazol vplyv na antioxidačné enzýmy. To zvyšuje riziko oxidačného poškodenia rastlín, ktoré boli ovplyvnené anthelmintikami, najmä v prítomnosti inej stresovej situácie. Anthelmintiká tak môžu spôsobiť oxidačný stres a znížiť antioxidačnú obranu.

2.4. *Glycine max* (Sója fazuľová)

Glycine max, slovenským názvom sója fazuľová, je subtropická rastlina, ktorá sa zaraďuje do čeľade Fabaceae (bôbovité). Je to jednoročná, samoopelivá rastlina so stĺpovitým koreňom, ktorá dorastá do výšky 20 cm-2 m. Vplyvom nitrifikačných baktérií rodu *Rhizobium* sa na koreni tvoria hľuzy, ktoré umožňujú väzbu vzdušného dusíka, ktorý sa spracováva do organických zlúčenín. Okrem toho tieto baktérie tiež zvyšujú koncentráciu izoflavónov. Byľ je priama, rozvetvená a dorastá do dĺžky 60-90 cm. Listy sú stopkaté, zložené a ich tvar a veľkosť sú charakteristické pre každú odrodu. Hroznovité kvetenstvo je strapec zložený z 5-10 kvetov. Plodom je struk obsahujúci zvyčajne 2-3 semená. Okrem viazania atmosférického dusíka, má táto plodina schopnosť rásť v rôznych prostrediach, znižovať eróziu pôdy a potláčať buriny (Jahodár 2006; Houba 2011; Jain et al. 2017).

Vo svojich strukoch *Glycine max* tvorí semenná, ktoré obsahujú rôzne živiny. Sójové bôby sa skladajú z proteínov (42 %), tukov, rozpustných uhl'ohydrátov, ako je rafináza a stachyóza, a nerozpustných uhl'ohydrátov, ako je vlákna (Prabakaran et al. 2018).

Sójové bôby tiež obsahujú rôzne nenahraditeľné zložky nazývané bioaktívne fytochemikálie, ako sú izoflavonoidy, fenoly, fytosteroly, saponíny a tokoferoly, v dôsledku čoho je sója považovaná za prínosnú pre ľudský organizmus (Kim et al. 2013). Medzi najdôležitejšie izoflavóny v sóji patria daidzein, genistein a glycitín (Fait 2013).

Pravidelná konzumácia sóji alebo sójových výrobkov pomáha znižovať alebo predchádzať niektorým chronickým ochoreniam, ako je rakovina, kardiovaskulárne ochorenia a osteoporóza. Príjem sójových proteínov alebo izoflavónov znižuje hladiny LDL-cholesterolu a celkový cholesterol v sére. Izoflavóny zo sóje znižujú výskyt rakoviny prsníka

a prostaty (Prabakaran et al. 2018). Okrem toho sa uvádza, že izoflavóny sóje pôsobia ako antioxidanty, odstraňujú reaktívne druhy kyslíka a tým zabráňujú oxidačnému poškodeniu v živom tkanive (Kim et al. 2013).

Ako zdroj bielkovín sa môže sója používať rôznymi spôsobmi vo forme sójového mlieka, sójového mäsa, tofu atď. Ako zdroj tukov sa zo sóji vyrábajú výrobky ako sójový olej, margarín, atď. Splňa požiadavky na nutričné potreby ľudí a zvierat vďaka obsahu početných zlúčenín, ktoré môžu pôsobiť ako antioxidanty a sú prospešné pre ľudské zdravie, pretože znižujú riziko mnohých chorôb (Jain et al. 2017).

2.5.Fenoly

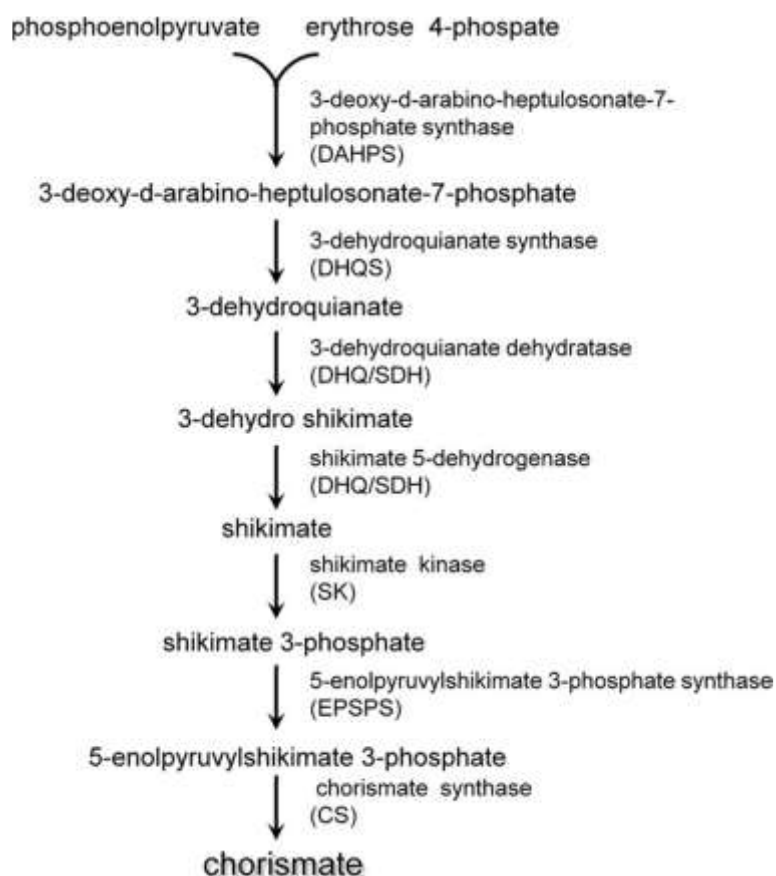
Jednu z najpočetnejších a najrozšírenejších skupín látok v rastlinnej ríši tvoria fenolické zlúčeniny (fenoly), z ktorých je v súčasnosti známych viac ako 8 000 fenolických štruktúr. Polyfenoly sú produkty sekundárneho metabolizmu rastlín. Výraz fenolické zlúčeniny zahŕňa značný rozsah látok, ktoré majú aromatický kruh nesúci jeden alebo viac hydroxylových substituentov. Väčšina hlavných tried rastlinných fenolických látok sa rozdeľuje na základe počtu uhlíkov v základnom skelete. Štruktúra prírodných polyfenolov sa líši od jednoduchých molekúl, ako sú fenolové kyseliny, po vysoko polymerované zlúčeniny, ako sú kondenzované taníny. Mnohé z nich majú významný biologický účinok pôsobiac napríklad ako antioxidanty, ale niektoré z nich sú toxické (Urquiaga, Leighton 2000).

Svojimi fyzikálnymi vlastnosťami sa fenoly podobajú na alkoholy, avšak majú vyšší bod varu a väčšiu rozpustnosť vo vode, vďaka tvorbe vodíkových mostíkov. Chemickými vlastnosťami sa od alkoholov odlišujú (Svoboda, 2005). Fenolické látky majú nízku teplotu topenia a kryštalizujú v bezfarebné hranoly s charakteristickým mierne štipľavým zápachom. V rozpustnom stave ide o číre, bezfarebné mobilné kvapaliny. Fenoly sú ľahko rozpustné vo väčšine organických rozpúšťadiel (aromatické uhl'ovodíky, alkoholy, ketóny, étery, kyseliny, halogénové uhl'ovodíky atď.) a o niečo menej rozpustné v alifatických uhl'ovodíkoch. Fenolické látky vytvárajú azeotropické zmesi s vodou a inými látkami (Rappoport, 2003). Charakterizujú ich kyslé vlastnosti získané prítomnosťou aspoň jedného hydroxyly naviazaného na aromatickom kruhu (Harmantha 2005).

Syntéza väčšiny fenolových látok v rastlinách prebieha tzv. šikimátovou cestou (Obr.2). Pri nej dochádza k premene fosfoenolpyruvátu pochádzajúceho z glykolýzy a

erytrozy-4-fosfát pochádzajúceho z pentózového cyklu na aromatické kyseliny fenylalanín, tyrozín a tryptofán. Reakcia je katalyzovaná 3-deoxy-D-arabino-heptulozonát-7-fosfát syntázou. Následne je produkt cyklizovaný na 3-dehydrochinát a redukovaný na kyselinu chinovú. Dehydratáciou a redukciou vzniká z 3-dehydrochinátu šikimát. 3-fosfo-šikimát reaguje s fosfoenolpyruvátom, potom dochádza k odštiepeniu fosfátu za vzniku chorizmátu. Prešmykom radikálu vzniká kyselina prefénová, z ktorej dekarboxyláciou a dehydratáciou vzniká fenylpyruvát, z ktorého transamináciou vzniká fenylalanín, a z iných intermediátorov triptofán a tyrozín. Tie sa potom stávajú prekursorami rozličných sekundárnych rastlinných metabolitov (Masarovičová et al. 2002).

Fenylalanín je deaminovaný za vzniku kyseliny škoricovej. Derivátom kyseliny škoricovej je kyselina kumarová, z ktorej sa vytvárajú fenolové zlúčeniny. Táto reakcia je katalyzovaná fenylalanínamónivou lyázou (Masarovičová et al. 2002).



Obr. 2 Šikimátová cesta (Tzin a Galili 2010)

Po dlhú dobu sa antioxidačný účinok fenolov posudzoval z hľadiska ich antiradikého účinku a ich schopnosti pôsobiť ako chelatačné činidlá kovov s premenlivou valenciou, čím sa prerušovali oxidačné reakcie vyskytujúce sa prostredníctvom mechanizmu voľných radikálových reťazcov. Nedávno boli identifikované a dôkladne študované me-

chanizmy nepriameho ochranného účinku fenolov, najmä ich schopnosť aktivovať systém antioxidačne reagujúcich prvkov Keap1 represorický proteín; z angl. Kelch-like ECH associated protein) / Nrf2(nukleárny faktor; z angl. Nuclear factor E2-related factor 2)/ ARE (antioxidačný responzibilný element), a indukovať autofágiu. Takýto účinok fenolických zlúčenín je dôležitý pre ochranu pred oxidačným účinkom a karbonylovým stresom (Zenkov et al. 2016).

S oxidačnými činidlami fenoly ľahko tvoria voľný radikál, ktorý môže dimerizovať za vzniku difenolov alebo môže byť oxidovaný za vzniku dihydroxybenzénov a chinónov. Vzhľadom na to, že fenolové radikály sú relatívne stabilné, fenol je vhodný scavenger radikálov a môže byť tiež použitý ako inhibítor oxidácie (Rappoport 2003).

Konzumovanie potravín bohatých na fenolické zlúčeniny priaznivo ovplyvňuje zápal, ktorý prispieva k vývoju a progresii ischemickej choroby srdca. S využitím štúdií *in vitro* a zvieracích modelov boli navrhnuté mechanizmy pôsobenia týchto zlúčenín na zápalovú aktivitu na kardiovaskulárnej úrovni, vrátane účinkov na kaskádu kyseliny arachidónovej, na signálne dráhy a receptory, zlepšenie cievnej funkcie a zníženie koncentrácie adhézných molekúl a chemokínov (Souza et al. 2017).

Bolo zistené že fenoly pozitívne pôsobia na ochranu neurónov a gliových buniek, majú tak neuroprotektívnu funkciu. Vzhľadom na široké rozloženie fenolov v prírodných zdrojoch, relatívne vysokú stabilitu v potravinách, ako aj vysokú intestinálnu absorpciu (v porovnaní s zložitejšími polyfenolmi) a účinnú absorpciu v mozgu, sa fenolové kyseliny môžu považovať za sľubné zlúčeniny pre budúcu kombinovanú liečbu neurologických porúch a ochorení, ako je napríklad Alzheimerova choroba (Szwajgier et al. 2017).

Okrem týchto účinkov majú fenoly pozitívny účinok pri zmierňovaní depresie, glutamátom indukovanej toxicite, epilepsii, nerovnováhy po traumatickom poškodení mozgu, poruchy pamäti indukovanej hyperinzulinémiou, poruchy sluchu a zraku, Parkinsonovej choroby, Huntingtonovej choroby, antiamyotrofickej laterálnej sklerózy alebo Chagasovej choroby (Szwajgier et al. 2017).

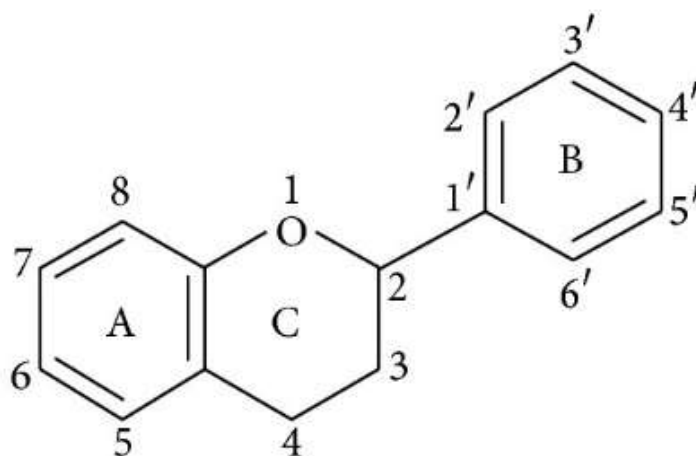
2.5.1. Flavonoidy

Flavonoidy pozostávajú z veľkej skupiny polyfenolových zlúčenín a nachádzajú sa predovšetkým v rastlinách. Majú benzo- γ -pyrónovú štruktúru. Ide o hydroxylované fenolické látky. Chemická povaha flavonoidov závisí od ich štruktúrnej triedy, stupňa hydroxylácie, iných substitúcií a konjugácií a stupňa polymerizácie. Funkčné hydroxylované

skupiny zaobstarávajú svoje antioxidačné účinky zachytávaním voľných radikálov alebo chelataciou kovových iónov, ktorá je dôležitá pri prevencii generovania radikálov, ktoré poškodzujú biomolekuly (Kumar a Pandey 2013).

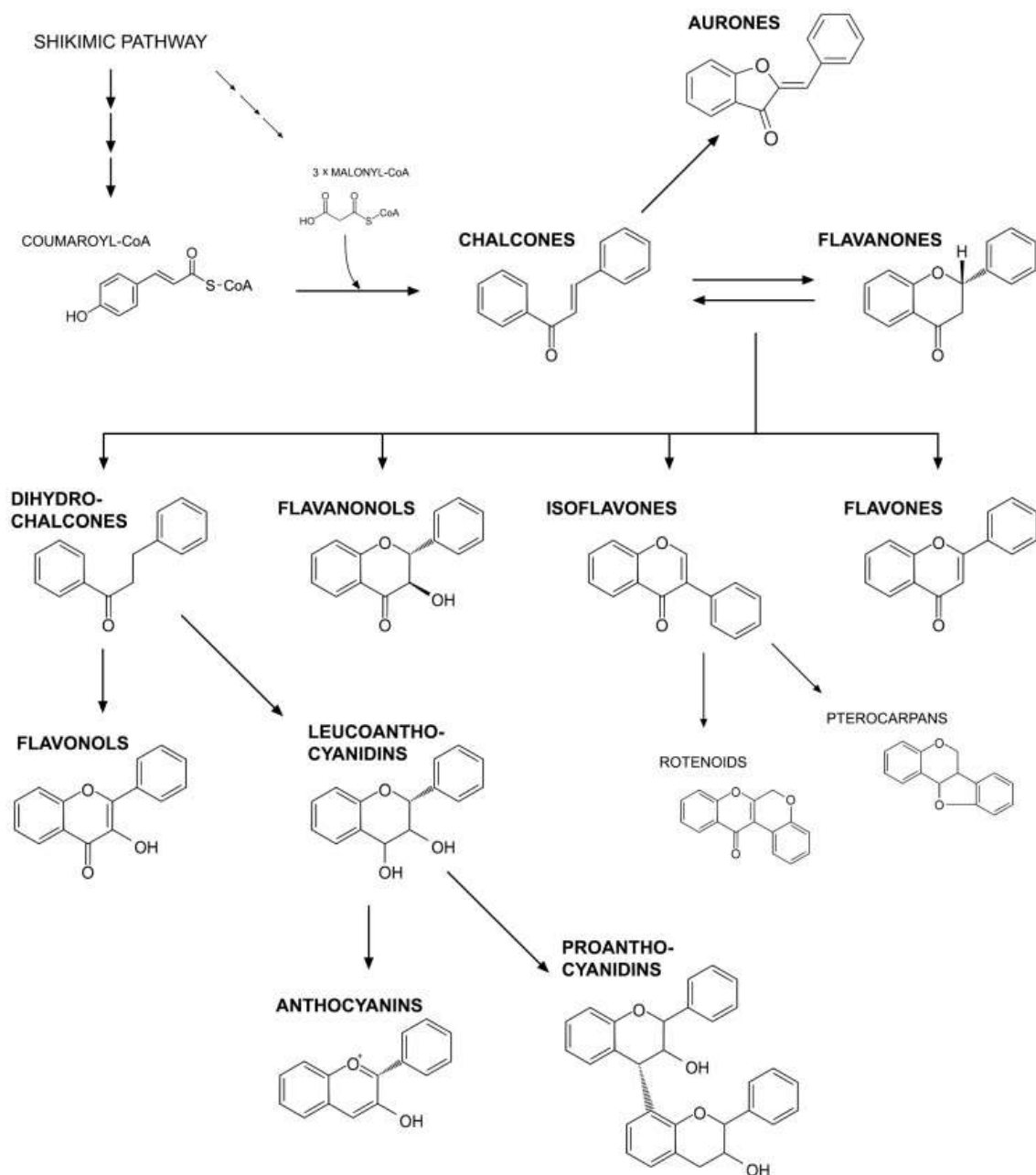
V roku 1930 bol prvýkrát izolovaný z pomaranča rutín, o ktorom sa najprv predpokladalo, že patrí medzi novú triedu vitamínov a bol pomenovaný vitamín P. Až neskôr sa ukázalo, že ide o flavonoid a v súčasnosti je objavených viac ako 9000 zlúčenín flavonoidov (Kumar a Pandey 2013; Mierziak et al. 2014).

Chemická štruktúra flavonoidov (Obr.3) pozostáva z 15- uhlíkového skeletu, skladajúceho sa z dvoch benzénových kruhov (A, B), ktoré sú spojené cez heterocyklický pyránový kruh (C). (obr.) Jednotlivé triedy flavonoidov sa líšia úrovňou oxidácie a rozdielnou substitúciou kruhu C.



Obr. 3 Základná chemická štruktúra flavonoidov (Kumar a Pandey 2013)

Podľa oxidácie centrálného pyránového kruhu flavonoidy rozdeľujeme do viacerých tried (Obr.4) – na flavóny, flavanoly, flavanóny, flavononoly, antokyány, chalkóny a izoflavóny. Tieto triedy sa navzájom odlišujú substituentmi základného skeletu a biologickými vlastnosťami (Masarovičová et al. 2002).



Obr. 4 Základné triedy flavonoidov (Mierziak et al. 2014)

Flavonoidy sa vyskytujú ako aglykóny, glykozidy a metylované deriváty. Základná štruktúra flavonoidov je aglykón, pozostávajúci z benzenového kruhu kondenzovaného so šesťčlenným kruhom, ktorý nesie v polohe 2 fenylový kruh ako substituent. Šesťčlenný kruh kondenzovaný s benzenovým kruhom je buď α -pyrón alebo jeho dihydroderivát. Poloha benzenoidového substituenta rozdeľuje skupinu na flavonoidy (poloha-2) a izoflavonoidy (poloha-3). Flavonoly sa odlišujú od flavanónov hydroxylovou skupinou v polohe 3 a C2-C3 dvojitou väzbou. Flavonoidy sú často hydroxylované v polohe 3,5,7,2,3',4' a 5'. Pri tvorbe glykozidov vzniká glykozidová väzba v polohe 3 alebo 7,

pričom najčastejšie pripájajúcim sa sacharidom je D-glukóza, L-ramnóza, glukoramnóza, galaktóza alebo arabinóza (Mierziak et al. 2014).

Syntéza flavonoidov prebieha pomocou kombinácie fenyylpropanoidovej a šikimátovej biosyntetickej dráhy spoločne s polyketidovou dráhou. Základný trojkruhový skelet flavonoidov je tvorený tromi molekulami malonyl-CoA (tvorené fenyylpropanoidovou cestou) a jednou molekulou 4-kumaroyl-CoA (tvorená v polyketidovej dráhe) pomocou enzýmu chalkónizomeráza a chalkosyntáza dvojstupňovou reakciu. Biosyntéza flavonoidov vychádza z aromatických aminokyselín tyrozínu a fenyylalanínu (tvorené šikimátovou cestou), ktoré sa potom konvertujú na kyselinu škoricovú a kyselinu parahydroxyškoricovú. Tieto reakcie katalyzuje tyrozínlyáza a fenyylalanínlyáza (Ferreira et al. 2012; Saito et al. 2013).

Flavonoidy sú dôležité pri poskytovaní farby, vône a chuti plodom, kvetom a semenám rastlín, čo z nich robí atraktanty pre hmyz, vtáky a cicavce. Majú dôležitú funkciu v štruktúrnej integrite rastlín, UV fotoprotekciu, reprodukciu a vnútornej regulácii a signalizácii rastlín. Pôsobia ako chemické modulátory rastlinnej komunikácie s mikróbami a hmyzom, buď ako atraktanty alebo repelenty, ale aj ako fytoalexíny proti patogénom. Flavonoidy chránia rastliny pred škodcami tým, že ovplyvňujú ich správanie, rast a vývoj. Okrem toho chránia rastlinu proti hmyzu pri ovipozícii a proti bylinožravcom pri kŕmení. Ich prítomnosť mení chuť rastlín, znižuje ich nutričnú hodnotu, stráviteľnosť, dokonca môže pôsobiť toxicky. Tiež indukujú noduláciu koreňa pri vylučovaní symbiotickými rhizóbmi fixujúcimi dusík (Falcone Ferreira et al. 2012; Mierziak et al. 2014).

Biologické funkcie flavonoidov sú spojené s ich potenciou cytotoxicitou a ich schopnosťou integrovať s enzýmami prostredníctvom proteínového komplexu. Niektoré flavonoidy slúžia ako ochrana pred stresom, tak že znižujú produkciu a potláčajú reaktívne druhy kyslíka (ROS), prostredníctvom supresie singletového kyslíka; inhibíciou enzýmov, ktoré generujú ROS (cyklooxygenáza, lipooxygenáza, aldóza reduktáza, xantín oxidáza); cheláciou iónov kovov, ktoré môžu katalyzovať produkciu ROS a narúšaním kaskády radikálových reakcií pri lipidovej peroxidácii (Falcone Ferreira et al. 2012; Mierziak et al. 2014).

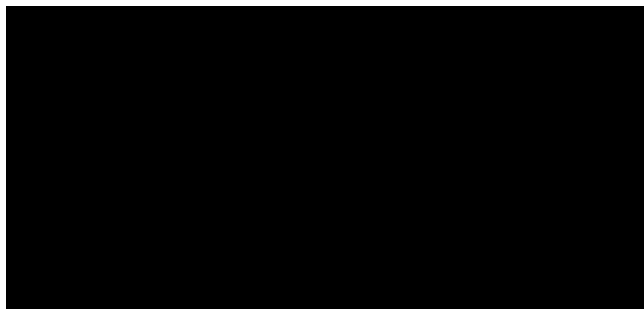
Majú rozsiahle biologické vlastnosti, ktoré podporujú ľudské zdravie a pomáhajú znižovať riziko ochorení. Pôsobia protizápalovo, hepatoprotektívne a majú antiulcerózne účinky. Mnohé z nich majú antialergické účinky a pôsobia proti mnohým infekčným

ochoreniam, vírusovým, bakteriálnym aj mykotickým. Inhibujú oxidáciu LDL prostredníctvom mechanizmu zahŕňajúceho zachytávanie voľných radikálov, čím znižujú riziko aterosklerózy (Mierziak et al. 2014; Kumar a Pandey 2013; Narayana et al. 2001).

Flavonoidy vykazujú koronárnu inhibičnú aktivitu, antihypertenzívny účinok a kardioprotektívnu aktivitu, ktorá sa využíva pri liečbe aterosklerózy. Okrem toho majú anti-neoplastický účinok, pôsobia antileukemicky a inhibujú rast buniek pri rakovine žalúdka. Taktiež majú účinok na cievy, inhibujú kapilárnu permeabilitu, majú antispazmotické a hypotenzívne účiny. Znižujú kapilárnu priepustnosť a využívajú sa pri liečbe flebosklerózy, Flavonoidy, ktoré obsahujú voľné hydroxylové skupiny v polohe 3, 3' a 4' majú priaznivé fyziologické účinky na kapiláry. Taktiež znižujú agregáciu erytrocytov a ich sedimentáciu. Orálne podávané flavonoidy slabo inhibujú vaskulárnu permeabilitu a zabráňujú pľúcnemu krvácaniu. Regulujú účinok estrogénu a androgénu naviazaním sa na 17-hydroxysteroidnú dehydrogenázu, a účinok progestínu a androgénu naviazaním na 3-hydroxysteroidnú dehydrogenázu. Okrem toho ovplyvňujú metabolizmus a pôsobenie hormónov štítnej žľazy (Narayana et al. 2001).

2.5.1.1 Genistein

Genistein (Obr.5) (4',5,7-trihydroxyizoflavón alebo 5,7 dihydroxy-3-(4-hydroxyfenyl)chromén-4-on, $C_{15}H_{10}O_5$) sa zaraďuje do izoflavónovej triedy flavonoidov s 15-uhlíkovým skeletom. Genistein sa skladá z dvoch aromatických kruhov, s tromi naviazanými reaktívnymi hydroxylovými skupinami. Okrem toho je tvorený šesťčlenným nearomatickým kruhom s včleneným atómom kyslíka a naviazanou ketonickou skupinou (Spagnuolo et al. 2015; Russo et al. 2016).

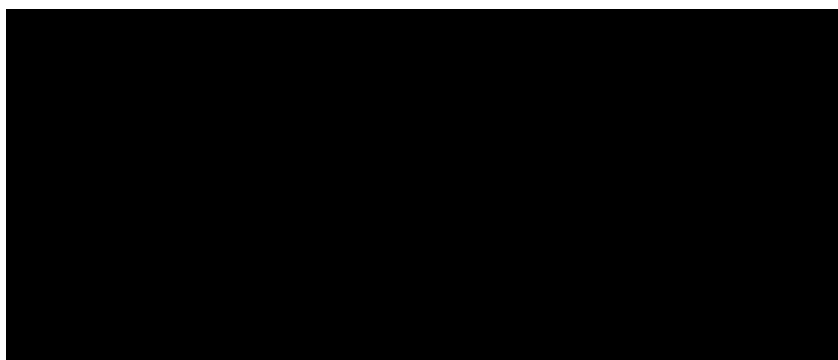


Obr. 5 Genistein (wikipedia.org)

Je typickým príkladom fytoestrogénnej zlúčeniny. Pomenovaný bol podľa rodu rastliny *Genista tinctoria* L.(kručinka farbiarska), z ktorej bol prvýkrát izolovaný v roku

1899. Vyskytuje sa ako hlavný sekundárny metabolit v *Trifolium* (Ďatelina) a *Glycine max* (Sója fazuľová) (Spagnuolo et al. 2015).

Glykozid genisteinu je tvorený z glykozylovaného rastlinného prekursoru genistinu (Obr.6). V rastlinách sa genistein vyskytuje ako aglykon (genistein), 7-O- β -glukozid (genistin), 6“-O-acetylglukosid (6“-O-acetylgenistin) a 6“-O-malonylglukosid (6“-O-malonylgenistin). Aktivovanie genistinu na genistein sa uskutočňuje v rámci hydrolyzy v hrubom čreve, kde sa následne transformuje na metabolit dihydrogenistein pomocou špecifickej bakteriálnej mikroflóry (Rahman Mazumder a Hongsprabhas 2016; Ji et al. 1999).



Obr. 6 Genistin (wikipeda.org)

Celková syntéza genisteinu bola objasnená v roku 1928, avšak genistein sa dá získavať aj použitím rozličných iných metód. Získava sa premenou flavanonu naringenínu, ktorý sa najprv podrobí odberu vodíkových radikálov na C-3 a následne migráciu B-kruhu z C-2 na C-3. Následne prebehne hydroxylácia na C-2 radikále. Táto reakcia vyžaduje molekulárny kyslík, NADPH a je katalyzovaná mikrozomálnym cytochromom P450, isoflavonsyntasou. Okrem toho bola vyvinutá metóda pre syntézu genisteinu, pri ktorej sa využívajú geneticky upravené bunky kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré obsahujú gén izoflavón syntázy (IFS) izolovaný z *Glycyrrhiza echinata* L (Spagnuolo et al. 2015; Dixon a Ferreira 2002).

Genistein má rôzne biologické účinky. Je to silný antibakteriálny a antioxidačný prostriedok. Okrem toho preventívne a terapeuticky pôsobí na rakovinu, postmenopauzálny syndróm, osteoporózu, cystickú fibrózu, alergie a kardiovaskulárne ochorenia u zvierat a ľudí. Má aj inhibičný účinok na enzýmy syntézy DNA topoizomerázy I a II, tyrozínkinázy, čím znižuje riziko vzniku rakoviny prostaty, vaječníkov, v niektorých prípadoch aj na nádor mozgu. V podstate inhibuje aj kožné karcinogenézy a kožné starnutie indukované ultrafialovým svetlom u myši a u ľudí. Genistein blokuje tvorbu DNA aduktov, inhibuje tyrozínové proteínové kinázy, ale aj DNA topoizomerázu II. Protinádo-

rové, protizápalové, protektívne kardiovaskulárne, enzýmovo inhibičné účinky genisteinu súvisia s jeho antioxidačnými aktivitami. Ovplyvňuje hladinu hormónov, ako je leptín, inzulín, hormóny štítnej žľazy, kortizol a kortikosterón, adrenokortikotropných a tyroidálnych hormónov (Banerjee et al. 2008; Spagnuolo et al. 2015; Prasain et al. 2004).

Genistein má difenolovú štruktúru. Má schopnosť väzby na estrogénové receptory (ER), čím zabraňuje naviazaniu silnejších estrogénov, vďaka čomu ovplyvňuje nádorovú transformáciu. Genisteinová afinita k estrogénovým receptorom α je 4%, zatiaľ čo k estrogénovým receptorom β až 87% (Kuiper et al. 1998).

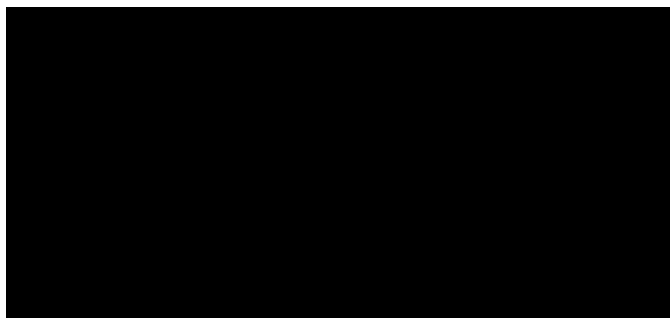
Genistein tiež dokáže zmeniť cestu Maillardovej reakcie tým, že zachytí koncové produkty pokročilej glykácie (AGE) v biologických aj proteín-laktózových suspenziách. Výsledkom je, že tento sójový izoflavón môže byť použitý na obohatovanie alebo zosilňovanie rôznych druhov potravinárskych výrobkov (El-Kordy a Alshahrani 2015; Rahman Mazumder a Hongsprabhas 2016; Traganos et al. 1992; Banerjee et al. 2008).

Rôzne experimentálne modely, vrátane štúdií *in vivo*, ukázali, že genistein zo sójových extraktov, jeho voľná forma a jeho glykozid genistin sú ľahko biologicky dostupné. Genistein je vysoko rozpustný v polárnych rozpúšťadlách, vrátane dimetylsulfoxidu, acetonu a etanolu, aj napriek tomu je jeho rozpustnosť vo vode oveľa nižšia (Spagnuolo et al. 2015).

Vďaka získaným informáciám o štrukturálnych znakoch genisteinu, je veľká snaha o syntézu jeho nových derivátov, ktoré sa môžu objavovať ako nové typy protinádorových, estrogénnych a antiosteoporetických prípravkov (Spagnuolo et al. 2015).

2.5.1.2. Daidzein

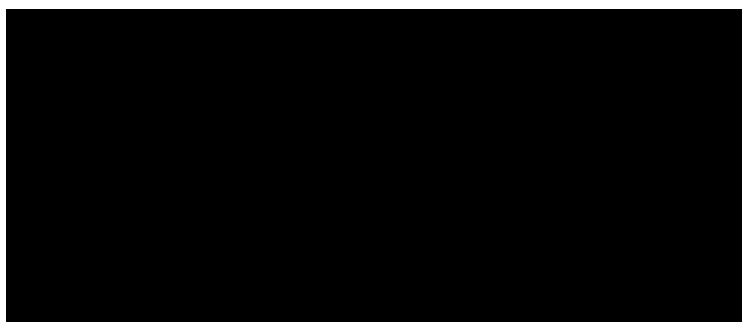
Daidzein (Obr.7) (4',7-dihydroxyizoflavón, $C_{15}H_{10}O_4$) je prirodzene sa vyskytujúci izoflavónový fytoestrogén patriaci k nesteroidným estrogénom, pričom jeho hlavným zdrojom je *Glycine max*, *Trifolium* a baktéria rodu *Micromonospora halophytica*. Daidzein je izoflavón, ktorý sa extrahuje najmä zo sójových rastlín (Sun et al. 2016).



Obr. 7 Daidzein (wikipeda.org)

Štruktúrne sa daidzein skladá z dvoch aromatických kruhov, na ktorých sú naviazané dve reaktívne hydroxylové skupiny. Okrem toho je tvorený šesťčlenným nearomatickým kruhom s včleneným atómom kyslíka a naviazanou ketonickou skupinou. Špecifickosť jeho štruktúry podmieňuje vysokú stabilitu (Rajan et al. 2017).

Daidzein je izoflavónový aglykón, čiže je deglykozylovanou formou. Jeho hlavným zdrojom je daidzin (Obr.8), kde cukrom je glukóza (Rowland et al., 2003).



Obr. 8 Daidzin (wikipedia.org)

Daidzein je fytoestrogén s podobnou štruktúrou ako 17- β - estradiol, vďaka čomu sa môže viazať na alfa a beta estrogénové receptory a má tak estrogénový účinok. Avšak daidzein sa od estradiolu odlišuje v rámci špecifickosti komplexu estrogénového receptora (Cooper a Yamaguchi 2004; Vitale et al. 2013).

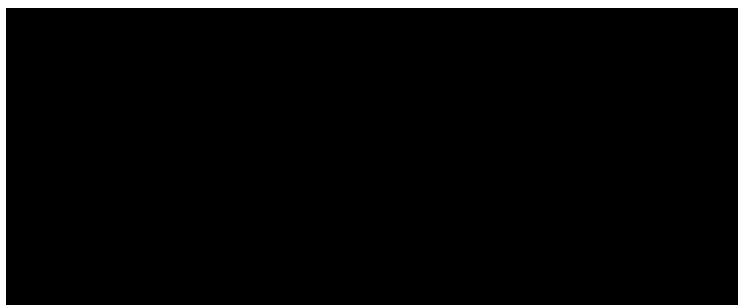
V rámci metabolizmu môže dôjsť k jeho redukcii, čím sa z neho stáva equol. Rozrušením benzenového kruhu vzniká O-desmethylangolensin. Štiepením kruhu dochádza k premene na p-ethylfenol alebo na 2- (4-hydroxyfenyl) propiónovú kyselinu. Niektoré z týchto metabolitov (napr. equol) vykazujú dokonca vyššie estrogénové účinky ako samotný daidzein. Viazaný vo forme glykozidu (daidzin) sa stáva neaktívnym a niektoré metabolity daidzeinu vykazujú podobný charakter. Produkcia týchto metabolitov daidzeinu je pre každého jedinca individuálna a ovplyvňuje ho viacero fyzikálnych faktorov, napríklad vek alebo pohlavie (Sun et al. 2016; Joannou et al. 1995; Prasain et al. 2004).

Svojou chemickou štruktúrou, ktorá je podobná ľudským estrogénom daidzein môže nahrádzať alebo interferovať s estradiolom a komplexom estradiol-receptor. Vďaka tomu daidzein pôsobí proti niektorým ochoreniam, ktoré súvisia s reguláciou estrogénu, ako je rakovina prsníka, osteoporóza, cukrovka alebo kardiovaskulárne choroby. (Vitale et al. 2013) Inhibuje enzýmy 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázu a ľudskú mitochondriálnu aldehyddehydrogenázu. Okrem toho má aj množstvo ďalších biologických účinkov nezávislých od jeho estrogénovej aktivity. Sú nimi protizápalové, protirakovinové účinky, inhibuje oxidačné poškodenie, chráni kožu a nervy. Tieto pozitívne účinky sú zapríčinené reguláciou imunitnej odpovede, vychytávaním voľných radikálov kyslíka a inhibíciou proliferácie (Sun et al. 2016; Masilamani et al. 2012).

Daidzein sa v tradičnej čínskej medicíne využíva pri liečbe horúčky, akútnej dyzentérie, hnačky, cukrovky, srdcových dysfunkcií a poškodenia pečene (Wong et al. 2011).

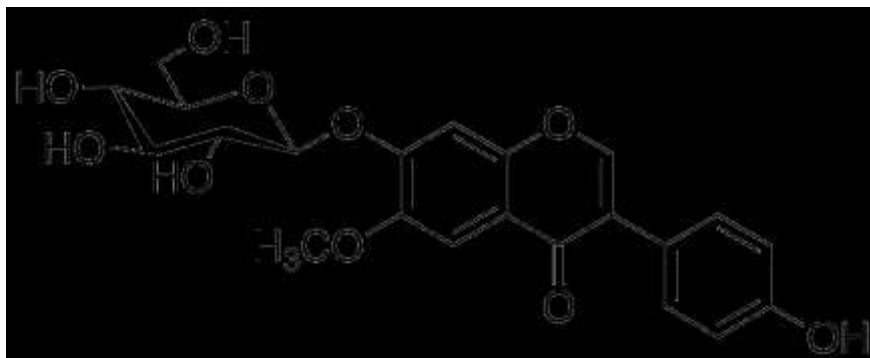
2.5.1.3. Glycitein

Glycitein (Obr.9) (6-methoxydaidzein, C₁₆H₁₂O₅) a jeho zodpovedajúce glykozidy predstavujú 5 až 10% z celkového množstva izoflavónov vo väčšine sójových potravín. V sójových klíčkoch tvorí glycitein najmenej 40% všetkých izoflavónov. Glycitein je zo všetkých izoflavónov najmenej preskúmaný (Zhang et al. 1999).



Obr. 9 Glycitein (wikipedia.org)

Má štyri rozličné chemické formy: aglykon (glycitein), 6“-O-acetylglycitin, 7-O- β -glukozid-glycitin (Obr.10) a 6“-O-malonylglycitin (Prasain et al. 2004).



Obr. 10 Glycitin (wikipeda.org)

Estrogénna aktivita glyciteinu je oveľa menšia ako estrogénna aktivita u daidzeinu alebo genisteinu (Lee et al. 2010). Okrem estrogénnej aktivity má glycitein antioxidačné, hypocholesterolemické účinky a má neuroprotektívny účinok proti toxicite indukovanej amyloidom. V podmienkach *in vitro* dokáže inhibovať proliferáciu a vykazuje silný inhibičný účinok na invazívnosť buniek MDA-MB-231 odvodených z rakoviny prsníka a znižuje aktivitu matrix metalopeptidázy 13 a expresiu matrix metalopeptidázy 8 v Jurkat bunkách. Jurkat bunky sú immortalizované línie ľudských T lymfocytových buniek, ktoré sa používajú na štúdium akútnej leukémie T lymfocytov. Jeho neuroprotektívna schopnosť spočíva v protizápalových účinkoch v periférnej nervovej sústave. Vďaka svojim účinkom sa o glycitine uvažuje ako o možnej budúcej liečbe kanceróz (Simons et al. 2005).

Má schopnosť inhibovať syntézu DNA a proliferáciu aortálnych buniek hladkej svaloviny, ktorá sa podieľa na vzniku aterosklerózy (Pan et al. 2001; Zhang et al. 2015).

2.6. Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Chromatografické metódy zaraďujeme medzi separačné metódy, kedy dochádza k rozdielnej distribúcii látok v zmesi medzi dve rozdielne nemiesiteľné fáze. Chromatografické metódy umožňujú okrem delenia veľmi zložitých zmesí, taktiež identifikáciu a kvantifikáciu jednotlivých látok. Stacionárnou (nepohyblivú) fázou je tuhá látka alebo kvapalina umiestnená na tuhom nosiči, ktorým sa plní chromatografická kolóna. Mobilná (pohyblivá) fáza je kvapalina (elučné činidlo), ktorá vymýva jednotlivé zložky z kolóny (Nováková 2013; Doležalová et al. 1995).

Kvapalinový chromatograf pozostáva z viacerých častí s nasledujúcou úlohou:

- uchovávanie a transport mobilnej fázy- zásobníky mobilnej fázy, vysokotlakové čerpadlo

- dávkovanie vzorky- autosampler, manuálny dávkovací ventil
- separácia látok- termostat, kolóna
- detekcia látok- detektor
- zaznamenávanie dát pre vyhodnotenie- počítač, software (Nováková 2013).

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (vysokotlaková kvapalinová chromatografia, HPLC) je špecifická forma kolónovej chromatografie, ktorá sa využíva na separáciu, identifikáciu a kvantifikáciu jednotlivých látok vo vzorke. Kolóna je naplnená stacionárnou fázou, ktorou sú najčastejšie častice z oxidu kremičitého alebo polyméru. Mobilnou fázou je zmes rozpúšťadiel najčastejšie acetonitril a/alebo metanol. Mobilná fáza spoločne s malým objemom vzorky (niekoľko μl) prechádza cez kolónu, interakcia jednotlivých zložiek vzorky sa mení, čo spôsobuje rozdiel v prietoku zložiek vzorky a nakoniec vedie k ich oddeleniu. Detektor zachytáva signál a ukazuje retenčné časy molekúl, ktoré sa líšia v závislosti od interakcii medzi stacionárnou fázou, analyzovanými molekulami a použitým rozpúšťadlom (Malviya et al. 2009; Thammana 2016;).

Pri HPLC sa používa kolóna s priemerom 2,1-5mm s dĺžkou 10-300 mm a je naplnená časticami o veľkosti 1 až 10 μm . Malý prierez kolóny a malé častice zaisťujú vysokú deliacu schopnosť tejto metódy. Prietok mobilnej fázy sa neuskutočňuje pomocou gravitácie, ale pod tlakom čerpadla 20-100 MPa. Eluát vytekajúci z kolóny prechádza priebežne detektorom. Ten automaticky a kontinuálne meria niektoré fyzikálne vlastnosti eluátu, napr. absorpciu-UV-VIS detektor, fluorescenciu- fluorescenčný detektor, index lomu- refraktometrický detektor a podobne. Odozva detektoru je priamo úmerná koncentrácii látky, ktorá sa určuje zo zápisu z plochy chromatografického píku alebo z jeho výšky. Závislosť medzi nameranou plochou alebo výškou píku a koncentraciou stanovenej látky sa určuje pomocou štandardu, pričom najpoužívanejšou je metóda kalibračnej krivky. V tomto prípade sa pred samotným meraním vzorky najprv analyzuje séria štandardov o známej ale rôznej koncentrácii, a vypočíta sa závislosť kalibračnej funkcie. V súčasnosti sa signál z detektoru automaticky kvantitatívne aj kvalitatívne vyhodnocuje pomocou mikroprocesoru, ktorý priebežne meria retenčný čas a integruje píky (Nováková 2013; Malviya et al. 2009; Thammana 2016).

Medzi hlavné výhody HPLC patrí široká variabilita výberu stacionárnej a mobilnej fázy, čím je umožnená voľba optimálnej selektivity separačného systému pre vybranú vzorku. Schopnosť identifikácie a súčasnej kvantifikácie jednotlivých zložiek v komplexnej zmesi je ďalšou výhodou. HPLC je senzitívna analytická technika, ktorá je zároveň

vysoko senzitívna voči kontaminantom, ktoré spôsobujú chybu v rámci analýzy, poškodzujú kolónu alebo znižujú životnosť kolóny, čo je najväčšou nevýhodou HPLC (Nováková et al. 2013).

2.6.1. Detekčné systémy

V HPLC sú detektory umiestnené za chromatografickou kolónou a zachytávajú rozdiel v signáli medzi priechodom čistej mobilnej fázy a mobilnej fázy, ktorá obsahuje analyt. Pri HPLC metóde môžu byť použité viaceré typy detektorov. Voľba detektorov, prípadne ich kombinácia závisí od typu skúmanej látky. Najpoužívanějšími detektormi sú fluorescenčný detektor, UV-VIS spektrofotometrický detektor, hmotnostný spektrometer, elektrochemický detektor. UV detektor a fluorescenčný detektor sú výhodnejšie ako hmotnostný spektrometer z hľadiska reprodukčnosti a robustnosti (Nováková 2013).

2.6.1.1. Detektor fotodiódového poľa

Detektor fotodiódového poľa (DAD) zaraďujeme medzi spektrofotometrické detektory, ktoré sú založené na princípe absorpcie žiarenia v oblasti vlnových dĺžok od 190 do 800 nm. Hlavnou výhodou tejto metódy je možnosť voľby najlepšej vlnovej dĺžky pre aktuálnu vzorku (Nováková 2013; Dong 2006).

DAD detektor v reálnom čase bez prerušenia chromatografickej separácie zaznamenáva celé spektrum. Mernou celou detektoru prechádza žiarenie zo zdroja, ktoré je holografickou mriežkou rozložené. Absorpciou v cele detektoru je žiarivý tok o určitej vlnovej dĺžke zoslabený a dopadá na jednotlivé fotodiódy. Tieto fotodiódy sú spojené s kondenzátorom vopred nabitým na určitú hodnotu. Pri dopade žiarenia na diódu vzniká fotoelektrický prúd vybíjajúci kondenzátor. Toto vybitie kondenzátoru je úmerne intenzite dopadajúceho žiarenia. V nasledujúcom kroku sa meria prúd, ktorý je potrebný na dobitie kondenzátorov. Veľkosť tohto prúdu sa ukladá do počítača. Veľmi rýchlo sa opakuje tento proces vybíjania a nabíjania, pričom sa pri každej vlnovej dĺžke v každom okamžiku snímajú informácie o absorbancii. Počet diód na poli určuje spektrálne rozlíšenie (Nováková 2013; Dong 2006).

DAD detektor v kooperácii s počítačom zabezpečuje detekciu látky pri hocijakej navolenej vlnovej dĺžke a taktiež zabezpečuje porovnávanie nasnímaných spektier s knižnicou spektier. Zároveň umožňuje vypočítanie čistoty píku, čím sa dá zistiť či sa v danom

píku nachádza zmes nerozdelených analytov alebo ide o čistú látku (Dong 2006; Nováková 2013).

2.6.1.2. Fluorescenčný detektor

Fluorescenčný detektor monitoruje emitované fluorescenčné svetlo HPLC analytu v kolóne. Ide o selektívnu a extrémne senzitívnu metódu, ktorá je pravdepodobne najcitlivejšia medzi modernými HPLC detektormi. Fluorescenčný detektor pozostáva z výbojky-xenónová alebo ortuťová, excitačného monochromátoru, emisného monochromátoru, prietokovej cely, štrbiny, limitného filtra a fotonásobiča na zosilnenie emitovaných častíc (Dong 2006).

Princíp fluorescenčného detektora spočíva na meraní sekundárneho emisného žiarenia, po tom čo látka absorbuje primárne excitačné elektromagnetické žiarenie. Tým, že látka absorbuje elektromagnetické žiarenie, prechádzajú molekuly látky zo základného singletového elektrónového stavu do rôznych vibračných hladín excitovaného singletového elektrónového stavu. Excitovaná molekula absorbovanú energiu buď vyžiari ako fluorescenčnú alebo ju premení na energiu vibračnú a odovzdáva ju iným molekulám. Stratením vibračnej energie prechádza molekula najskôr do základného vibračného stavu a následne emituje fluorescenčné žiarenie s rovnakou vlnovou dĺžkou ako má absorbované žiarenie, často sa však stáva, že vlnová dĺžka emitovaného žiarenia je vyššia v dôsledku vibračnej relaxácie (Nováková 2013).

Fluorescenčné detektory majú schopnosť regulácie vlnovej dĺžky excitačného a emitovaného žiarenia počas elúcie, čím sa dosiahne maximálna citlivosť pre jednotlivé separované látky (Nováková 2013).

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce je zistiť, či prítomnosť anthelmintík v rastlinách ovplyvňuje produkciu sekundárnych metabolitov. Študovaný bol vplyv bežne používaných anthelmintík (FBZ, IVM) na biosyntézu vybraných polyfenolických látok nachádzajúce sa v sóji fazuľovej (*Glycine max*).

Pre splnenie tohto cieľu sme sa zamerali na :

- vypestovanie *Glycine max* a ich inkubácia s anthelmintikami (FBZ, IVM)
- spracovanie rastlinných vzoriek (koreň, list, struk, semeno)
- stanovenie celkových fenolov a flavonoidov
- stanovenie koncentrácie vybraných izoflavónov (genistein, daidzein, glycitein) v *Glycine max* pomocou HPLC metódy

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Materiál, pomôcky, prístroje

4.1.1. Chemikálie

Methanol

Dimethylsulfoxid

Kyselina gallová (Sigma Aldrich)

Uhličitan vápenatý

destilovaná voda

Folin-Ciocalteu reagencia

Chlorid hlinitý (Lachema Brno, Chemopol Praha)

Octan draselný (Lachema Brno, Chemopol Praha)

Rutin (Sigma Aldrich)

4.1.2. Biologický materiál

Boli použité vzorky *Glycine max* vypestované a ovplyvnené anthelmintikami FBZ a IVM v Ústave experimentálnej botaniky Akadémie vied ČR v Prahe.

4.1.3. Pomôcky

Trecia miska s tlčíkom, nožnice, lyžičky, pinzety, automatické pipety, alobal, elektroforetická vaňa, kadičky, magnetické miešadlo, mikrotitračné doštičky, mikroskú-mavky Eppendorf, odmerné valce, plastové skúmavky s uzáverom, stojany na skúmavky.

4.1.4. Prístroje

Analytické váhy

Magnetické miešadlo

Ultrazvuk

Trepačka

Centrifúga

Termomixér Eppendorf

Koncentrátor Eppendorf

Spektrofotometer Tecan, Švajčiarsko

Chromatograf (Agilent Technologies, USA)

5. METODIKA PRÁCE

5.1. Pestovanie rastlín a ovplyvnenie anthelmintikami

Rastlinné vzorky *Glycine max* boli pestované v Ústave experimentálnej botaniky Akadémie vied ČR v Prahe. V diplomovej práci bolo analyzovaných päťdesiatštyri vzoriek rastlín. Analyzovali sme vzorky zberané počas rokov 2017-2018. Z rastlín sa hodnotili koreň, list, semeno a struk.

Semená rastlín *Glycine max* odroda *Moravians* boli získané zo spoločnosti Agritec Šumperk. Semená boli dvadsaťštyri hodín namočené a následne vysadené po jednom až troch semenách do Petriho misiek, ktoré boli uzavreté parafilmom a uschované v tme. Klíčivosť bola u rastlín dobrá a mohlo tak dôjsť k ich presadeniu do väčších kvetináčov s bambusovými rebríkmi a ich pestovaniu v skleníku. S rastlín sa vytvorili tri skupiny, každá po šesť rastlín v jednej miske. Jednotlivé skupiny rastlín boli stresované trikrát do týždňa. Jedna skupina bola polievaná roztokmi 10 μM ivermektínu (IVM rozpustený v DMSO a pridaný do vody). Druhá skupina rastlín bola polievaná roztokmi 10 μM fenbendazolu (FBZ bol rozpustený v DMSO a pridaný do vody) a posledná skupina rastlín bola polievaná 0,1% roztokom DMSO vo vode ako kontrola.

Rastliny sa zberali v rozličných časových intervaloch a časti rastlín boli rozdelené do samostatných vreciek pre korene, listy, semená a struky a boli lyofilizované. Uchovávané boli pri 4-8 °C a prevezené do Hradca Králové.

Ako vzorky sme použili rastliny pestované v skleníku. Začiatok zberu bol v roku 2017, odkiaľ sme získali tri zbery. Prvý zber bol 22.09.2017, zberané boli len listy sóji, ktoré boli stresované piatimi dávkami anthelmintík v priebehu dvanástich dní. Druhým zberom boli len listy zberané 13.10.2017, ktoré boli ovplyvňované štrnástimi dávkami anthelmintík počas tridsiatich troch dní. Tretím zberom sa ukončilo pestovanie v roku 2017 a pozberali sa zvyšné listy, plody so strukmi a korene. Zber prebehol 26.10.2017, rastliny boli stresované devätnástimi dávkami v priebehu štyridsiatich šiestich dní. Pestovanie rastlín pokračovalo v roku 2018 odkiaľ sme tiež získali tri zbery. Prvý zber bol 26.06.2018 kedy sa zberali celé rastliny, ktoré boli ovplyvňované anthelmintikami v siedmych dávkach počas pätnástich dní. V druhom zbere sa zberali listy, semená so strukom a korene, ktoré boli ovplyvňované dvanástimi dávkami v priebehu dvadsiatich deviatich dní. Pri treťom zbere sa zberali už suché lisy, korene a struky so semenami ovplyvňovanými anthelmintikami v devätnástich dávkach počas štyridsiatich štyroch dní. Použili sme aj *in vitro* vypestované rastliny (korene a stonky) sóji zberané dňa 17.06.2018.

5.2. Príprava vzorky

Odvážili sme 0,1 g sušiny vzoriek *Glycine max*, ktoré sme zmiešali so 4 ml methanolu. Vzorky sme potom sonikovali v ultrazvuku 30 minút a následne sa 1 hodinu inkubovali pri izbovej teplote. Následne sa vzorky 5 minút miešali na trepačke a boli stočené na centrifúge (1000 rpm, 5 minút). Supernatant sme odpipetovali a nechali vysušiť v koncentrátore pri teplote 45 °C. Pellet sme opätovne extrahovali v 4 ml methanolu a nechali inkubovať cez noc. Po 24 hodinách sme vzorky opäť 30 minút sonikovali v ultrazvuku, 5 minút pretrepali na trepačke a stočili na centrifúge (1000 rpm, 5 minút), supernatant sme odpipetovali a nechali odpariť v koncentrátore pri teplote 45 °C. Takto pripravené vzorky sme potom uchovávali v mrazničke.

5.3. Stanovenie celkového obsahu fenolov

Stanovenie celkových fenolických látok bolo prevedené modifikovanou metódou Folin-Ciocalteu podľa (Singleton et al. 1999). Ako štandard sme použili kyselinu gallovú.

Zmiešané odparky sme nariedili v 1 ml dimethylsulfoxidu na koncentráciu 100 mg/ml a následne rozpustili v destilovanej vode na koncentráciu 1 mg/ml. Pripravili sme si roztok 12% Na₂CO₃.

Takto nariedené vzorky sme nanášali na mikrotitračnú platničku v štyroch rozličných koncentráciách získaných geometrickým riedením, každú koncentráciu osemkrát. K vzorke sme pridali 25 µl roztoku reagentie Folin-Ciocalteu a nechali premiešať v termomixére (300 rpm, 10 minút), pridali sme 12% Na₂CO₃ a vzorky sa 1 hodinu inkubovali pri teplote 37 °C. Absorbancia jednotlivých roztokov sa merala pri vlnovej dĺžke 760 nm na spektrofotometre Tecan. Každá vzorka bola meraná celkovo trikrát (v troch nezávislých experimentoch).

Celková hodnota fenolických látok sa získala z kalibračnej krivky (Obr. 11) pomocou regresnej rovnice $y=0,0672x+0,0299$ a bola vyjadrená ako ekvivalent kyseliny gallovej (GAE) podľa vzorca

$$c = \left(\frac{A-0,0299}{0,0672} \right) [\text{mg GAE/g sušiny}]$$

$$C = c \cdot V / m;$$

kde C je celkový obsah fenolických látok v mg GAE/g sušiny

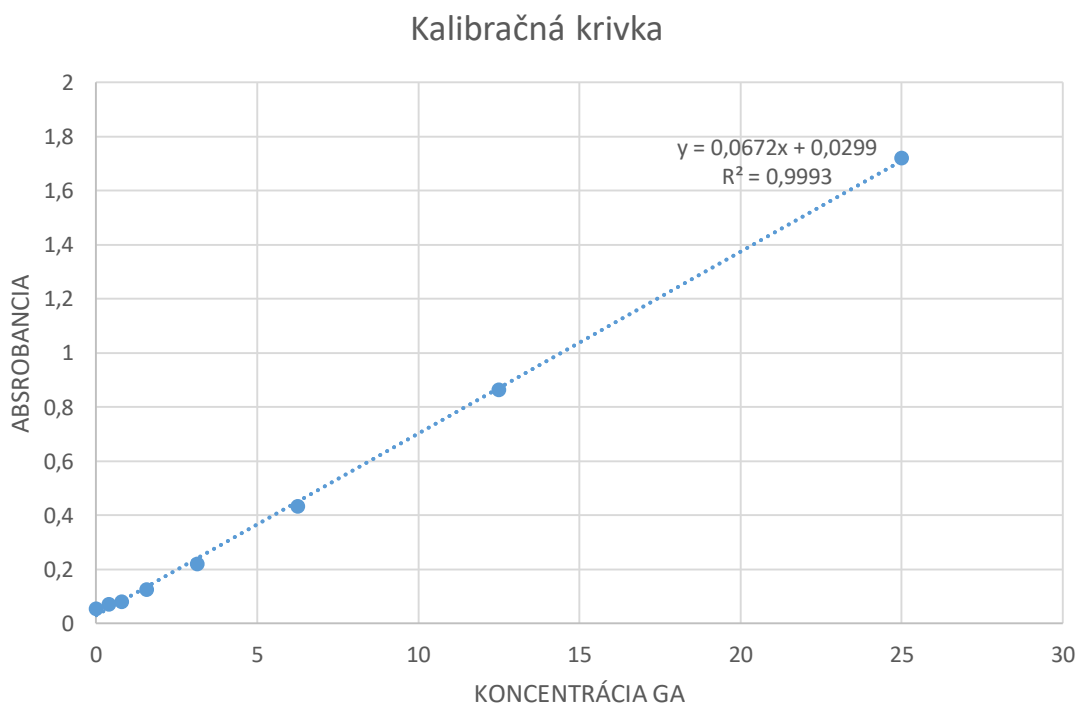
c je koncentrácia kyseliny gallovej v mg/ml stanovená z kalibračnej krivky

V je objem extraktu v mililitroch

m je navážka čistého rastlinného extraktu v gramoch. (Barku et al. 2013)

Kalibračná krivka

Na analytických váhach sme si odvážili 0,001 g kyseliny gallovej a nariedili sme ju v methanole na koncentráciu 1 mg/ml. Trikrát sme rozriedili 75 μ l takto namiešaného roztoku v 925 μ l destilovanej vody na koncentráciu 75 μ g/ml. Prvá koncentrácia našej koncentračnej rady je 25 μ g/ml a pokračovali sme geometrickým riedením, čím sme získali hodnoty 25/12,5/6,25/3,125/1,56/0,78/0,39 μ g/ml. K takto napipetovanému roztoku sme pridali reagensiu Folin-Ciocalteu a roztok 12% Na_2CO_3 . Po hodinovej inkubácii pri teplote 37 °C sme merali absorbanciu na spektrofotometre Tecan pri vlnovej dĺžke 760 nm.



Obr. 11 Kalibračná závislosť kyseliny gallovej

5.4. Stanovenie obsahu flavonoidov

Kolorimetrická metóda s chloridom hlinitým a dusitanom sodným bola použitá na stanovenie celkového obsahu flavonoidov vo všetkých rastlinných extraktoch *Glycine max*. Ako štandard sme použili rutinu.

Použili sme vzorky, ktoré sme si pripravili pri meraní celkových fenolických látok v koncentrácii 100 mg/ml v dimethylsulfoxide. Pripravili sme si roztoky 2,25% AlCl_3 zmiešaním 2,25 g AlCl_3 so 100 ml destilovanej vody a 100 Mm CH_3COOK zmiešaním 0,98 g CH_3COOK so 100ml destilovanej vody. Vzorky v objeme 30 μl sme trikrát rozriedili v 970 μl methanolu a získali sme koncentráciu 1 mg/ml.

Na mikrotitračnú platničku sme si naniesli do prvej jamky v každom z ôsmich stĺpcov 200 μl takto nariadenej vzorky a do ostatných jamiek sme napipetovali 100 μl destilovanej vody. Z prvej jamky sme odobrali 100 μl vzorky, pridali ich do druhej jamky k 100 μl destilovanej vody, premiešali sme to, opätovne sme napipetovali 100 μl . Takto zriedenú vzorku sme pridali do ďalšej jamky a rovnakým postupom sme pokračovali až po piatu jamku. Odtiaľ sme taktiež odobrali 100 μl zriedenej vzorky. Do každej jamky sme následne napipetovali 100 μl destilovanej vody aby sme mali konečný objem v jamke 200 μl . K takto zriedenej vzorke sme pridali 40 μl 2,25% AlCl_3 a 60 μl 100 Mm CH_3COOK a nechali sme to inkubovať desať minút v termomixére za stáleho miešania (300 rpm, 27 °C). Absorbancia vzoriek sa merala na spektrometre Tecan pri vlnovej dĺžke 415 nm. Každá vzorka bola meraná celkovo trikrát.

Celková hodnota flavonoidov bola získaná výpočtom z kalibračnej krivky (Obr.12) pomocou regresnej rovnice $y=0,1445x+0,0388$ a bola vyjadrená ako mg ekvivalentu rutinu (RUT)/ g sušeného rastlinného materiálu podľa vzorca

$$c = \left(\frac{A-0,1445}{0,0388} \right) [\text{mg RUT/ g sušiny}]$$

$$C = c \cdot V / m;$$

kde C je celkový obsah flavonoidov v mg RUT/ g sušiny

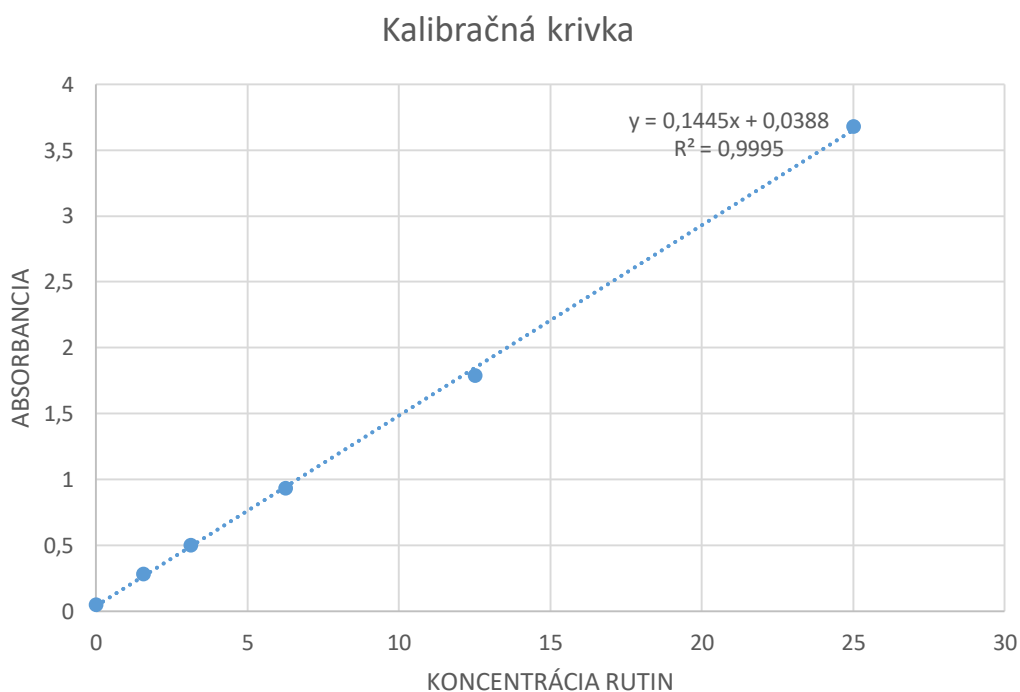
c je koncentrácia rutinu v mg/ml stanovená z kalibračnej krivky

V je objem extraktu v mililitroch

m je navážka čistého rastlinného extraktu v gramoch

Kalibračná krivka

Odvážili sme si 0,001 g rutinu na analytických váhach a zmiešali sme ho s metanolom, aby nám vznikla koncentrácia 1 mg/ml. Trikrát sme rozriedili 30 μ l rutinu v koncentráciu 1 mg/ml v 970 μ l methanolu na koncentráciu 300 μ g/ml. Prvá finálna koncentrácia našej koncentračnej rady je 100 μ g/ml. Geometrickým riedením sme získali koncentračnú radu s hodnotami 100/50/25/12,5/6,25/3,125/1,56/0 μ g/ml. K takto zriedeným roztokom sme pridali 2,25% AlCl_3 a 100 Mm CH_3COOK . Po inkubácii v termomixére (300 rpm, 10 minút, 27 °C) sme merali absorbanciu na spektrofotometre Tecane pri vlnovej dĺžke 415 nm.



Obr. 12 Kalibračná závislosť rutinu

5.5. Stanovenie koncentrácie izoflavónov

Použili sme metódu podľa (Szymczak et al. 2017). Kvapalinový chromatograf (Agilent, 1100 Series HPLC Value System) s kolónou Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m (Agilent Technologies) bol použitý na separáciu jednotlivých zložiek vo vzorkách. Stacionárna fáza bola tvorená uhl'ovodíkovými reťazcami C18 a fungovala ako miesto, kde došlo k zachyteniu jednotlivých zložiek vzorky na základe

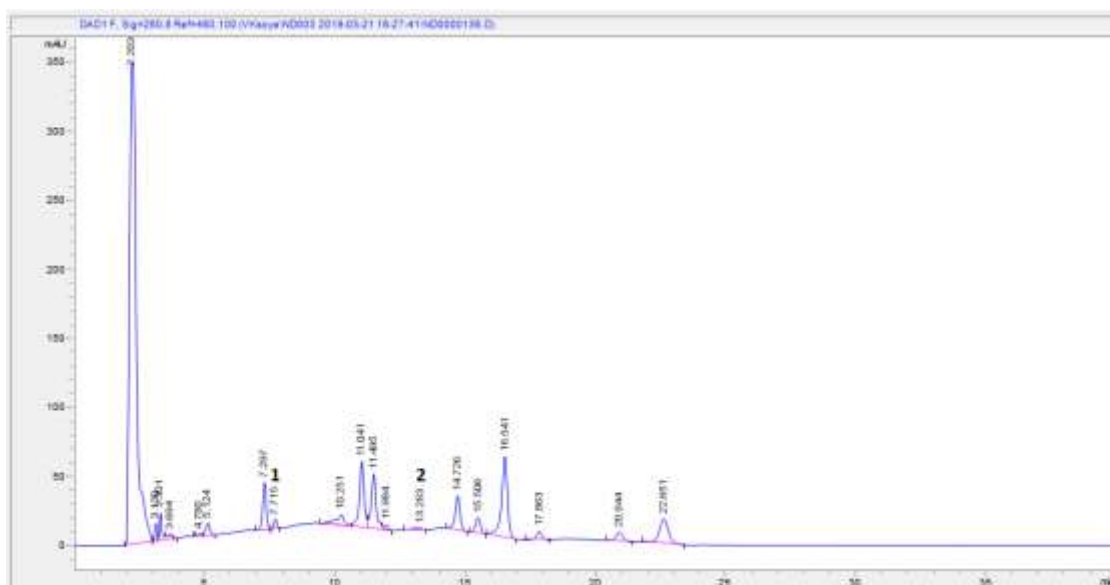
ich interakciu s fázou. Mobilná fáza sa skladala z roztoku A, ktorý obsahoval acetonitril a roztoku B, ktorý obsahoval destilovanú vodu s 0,025% kyselinou trifluóroctovou. Pre samotnú analýzu sme zvolili princíp gradientovej elúcie, pri ktorej sa zloženie mobilnej fázy plynule mení s časom analýzy. Na kolónu bolo nastrieknuté 50 µl vzorky a analýza sa uskutočnila pri prietoku o rýchlosti 1,5 ml/min. Pre odstránenie nečistôt z predchádzajúcich meraní bol prístroj premytý acetonitrilom a vodou pred každou analýzou.

Detekcia zložiek bola uskutočnená pomocou fotometrického detektoru DAD (detektor diodového poľa) a FLD (fluorimetrický detektor). Izoflavóny boli merané pri vlnových dĺžkach 200 až 400 nm. Kvantitatívna analýza sa uskutočnila pri vlnovej dĺžke 249 nm pre daidzein a jeho deriváty, pre analýzu glyciteinu a jeho derivátov, ako aj pre genistein a jeho deriváty prebehlo meranie pri vlnovej dĺžke 260 nm. Chromatografické frakcie sa eluovali pri retenčnom čase charakteristickom pre skúmané zlúčeniny.

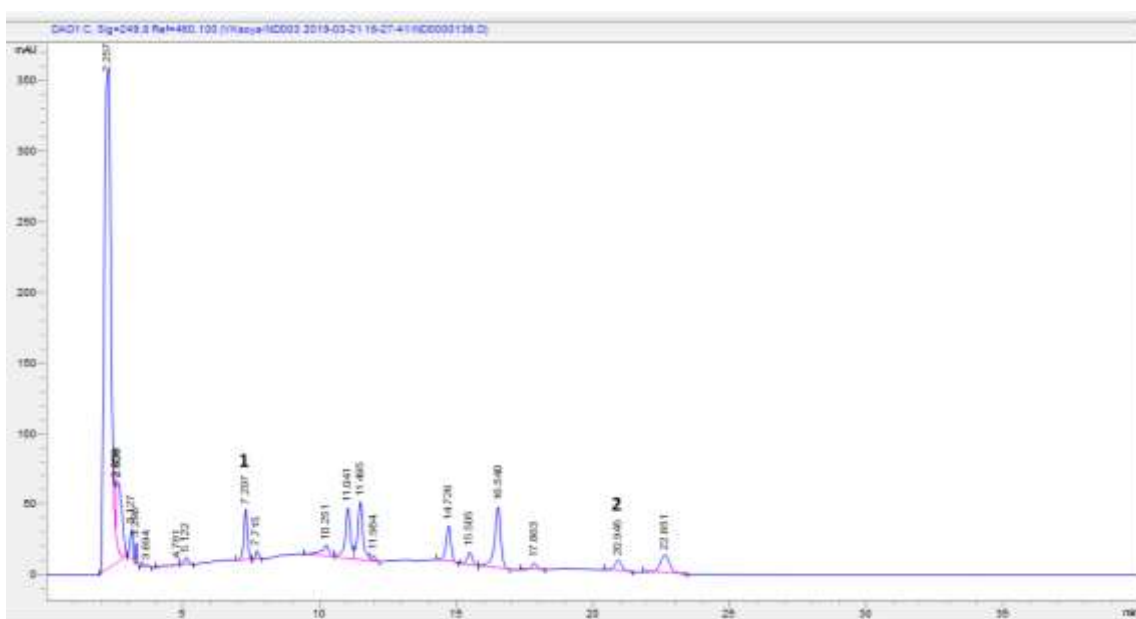
Na zavedenie nových kalibrácií do metódy merania izoflavónov pomocou HPLC analýzy boli vždy pre jednotlivé aglykony pripravené príslušné roztoky. Pre každú kalibráciu daného izoflavónu sme použili vždy štyri roztoky o koncentrácii zodpovedajúcej koncentračnej rade 0,25; 0,5; 0,75; 1 µg/ml. V tabuľke 1 sú uvedené retenčné časy pre jednotlivé izoflavóny. Chromatogramy (Obr. 13, Obr. 14) vzoriek boli vyhodnotené na základe retenčných časov, ktoré zodpovedajú štandardom a pomocou absorbancie z nameraných kalibrácií.

Tabuľka 1 Retenčné časy štandardov izoflavónov

Izoflavóny	Retenčný čas (min)
Genistein	13,12
Genistin	13,28
Glycitin	7,67
Daidzein	20,72
Dadzin	7,28



Obr. 13 Chromatogram so záznamom retenčného času glycitinu, genisteinu a genistinu meraného pri žiarení o vlnovej dĺžke 260 nm, kde osy zodpovedajú x = čas (min), y = absorbanca (mAU). Chromatogram so záznamom retenčných časov, kde 1= glycitin a 2=genistin.



Obr. 13 Chromatogram so záznamom retenčného času daidzeinu a daidzinu meraného pri žiarení o vlnovej dĺžke 249 nm, kde osy zodpovedajú x = čas (min) a os y = absorbanca (mAU). Chromatogram so záznamom retenčného času, kde 1= daidzin a 2= daidzein.

6. VÝSLEDKY

Rastliny *Glycine max* (Sója fazuľová) boli počas celého svojho rastu ovplyvňované roztokmi buď fenbendazolom, alebo ivermektínom alebo roztokom DMSO ako kontrolou. Rastlinný materiál bol následne pozbieraný vo rozličných časových intervaloch. Rastlinné časti sa rozdelili do samostatných vrecúšok a boli lyofilizované.

V laboratóriu boli z týchto rastlinných častí pripravené extrakty, ktoré boli ďalej analyzované. Celkovo bolo pripravených päťdesiatštyri vzoriek, ktoré boli rozdelené podľa času zberu, rastlinnej časti a roztoku, ktorým boli ovplyvňované. Pre stanovenie celkových fenolických látok bola použitá metóda Folin-Ciocalteu vyhodnotená spektrofotometricky. Stanovenie obsahu celkových flavonoidov bolo vykonané pomocou kolorimetrickej metódy chloridu hlinitého s octanom draselným, ktorá bola taktiež vyhodnotená spektrofotometricky. Pomocou HPLC metódy sme stanovili koncentráciu vybraných izoflavónov: genisteinu, daidzeinu a glyciteinu. Takto namerané hodnoty boli vyhodnotené a porovnávali sa hodnoty medzi rastlinnými časťami, ktoré boli ovplyvnené roztokom DMSO a slúžili ako kontrola, a medzi rastlinnými časťami, ktoré boli ovplyvnené roztokmi fenbendazolu a ivermektínu.

6.1. Koncentrácia celkových fenolov

Koncentrácia celkových fenolov bola vyjadrená ako ekvivalent kyseliny gallovej na hmotnosť vzorky sušiny v gramoch (mg GAE/g DW). Na určenie štatistickej významnosti zmien sme použili Studentov t-test, $p < 0,05$. Výsledky sú v práci spracované graficky aj numericky.

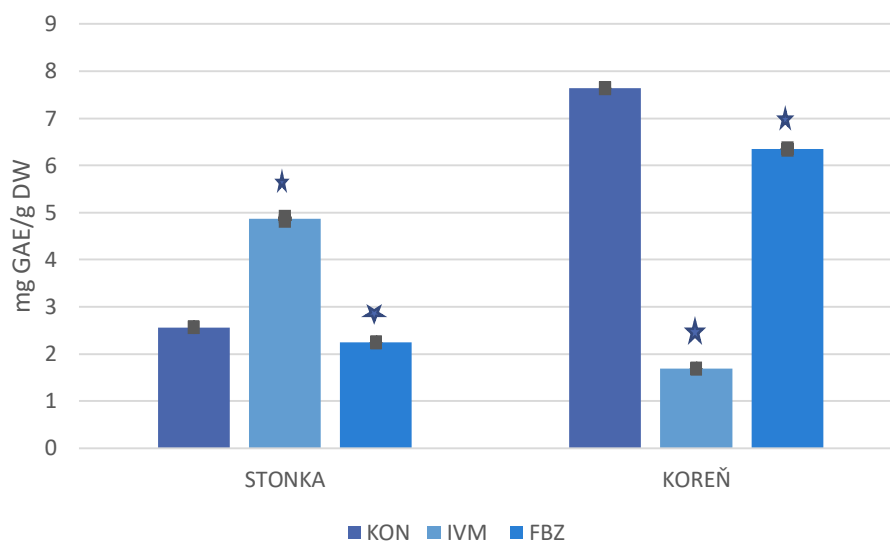
Tabuľka 2 Koncentrácia fenolických látok v stonke a koreni in vitro vypestovaných vzorkách zberaných 17.06.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
Stonka	2,562± 0,002	4,872± 0,008 *	2,250± 0,006 *
Koreň	7,640± 0,012	1,688± 0,012 *	6,348± 0,022 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Pri porovnaní so stonkou (Tabuľka 2, Obr.15), ktorá slúžila ako kontrola došlo v stonke, ktorá bola stresovaná roztokom IVM k nárastu celkových fenolických látok o 90 % a v stonke stresovanej FBZ k úbytku fenolických látok o 13 %. Koreň stresovaný IVM

obsahoval o 78 % menej fenolických látok a koreň stresovaný FBZ obsahoval o 17 % menej fenolických látok ako kontrolný koreň.



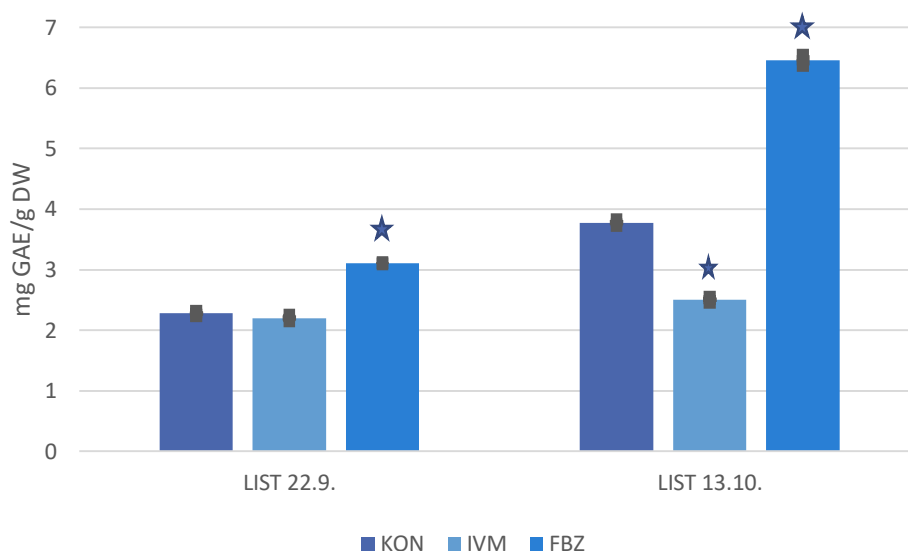
Obr. 15 Porovnanie zmien koncentrácií fenolických látok vo stonke a koreni vypestovaných *in vitro* zberaných 17.06.2018 po stresovaní IVM a FBZ voči KON

Tabuľka 3 Koncentrácia fenolických látok vo vzorkách zberaných 22.09.2017 a 13.10.2017

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List 22.9.	2,278± 0,033	2,202± 0,038	3,110± 0,011 *
List 13.10.	3,777± 0,039	2,502± 0,036 *	6,453± 0,084 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy zberané 22.09.2017 stresované IVM obsahovali o 4 % menej fenolických látok ako kontrola a listy stresované FBZ obsahovali o 36 % viac fenolických látok. Vzorky zberané dňa 31.10.2017 ovplyvnené IVM vykazovali úbytok fenolických látok o 34 % a naopak vzorky ovplyvnené FBZ vykazovali nárast fenolických látok až o 70 % oproti kontrole (Tabuľka 3.Obr.16).



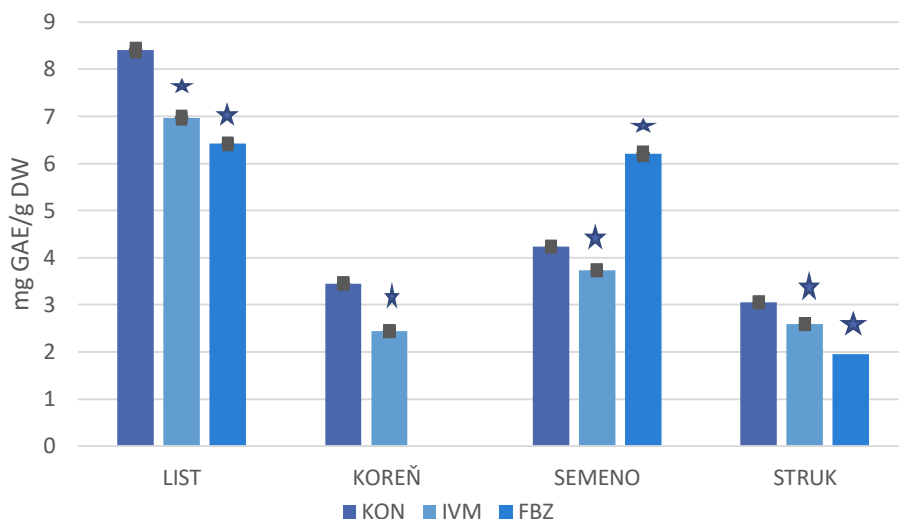
Obr. 16 Porovnanie zmien koncentrácií fenolických látok v listoch zberaných 22.09. 2017 stresovaných 5 dávkami roztokmi IVM a FBZ voči KON a v listoch zberaných 13.10.2017 po stresovaní 14 dávkami roztokmi IVM a FBZ voči KON

Tabuľka 4 Koncentrácia fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 26.10.2017

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	4,205± 0,033	3,486± 0,030 *	3,211± 0,014 *
Koreň	1,725± 0,010	1,219± 0,004 *	
Semenó	2,117± 0,001	1,863± 0,006 *	3,103± 0,030 *
Struk	1,525± 0,001	1,295± 0,003 *	0,973± 0,002 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy ovplyvnené IVM obsahovali o 18 % menej fenolických látok a listy ovplyvnené FBZ obsahovali o 24 % menej fenolov ako kontrola. Pri vzorkách koreňov došlo pri IVM k úbytku o 29 % oproti kontrole (koreň ovplyvnený FBZ nebol meraný pre nedostatok materiálu). Semená ovplyvnené IVM obsahovali o 12 % menej fenolov ako kontrola a semená ovplyvnené FBZ naopak obsahovali o 46 % viac fenolických látok. Struky stresované IVM vykazovali o 16 % menej fenolických látok a struky stresované FBZ vykazovali o 37 % menej fenolov ako kontrola (Tabuľka 4, Obr.17).



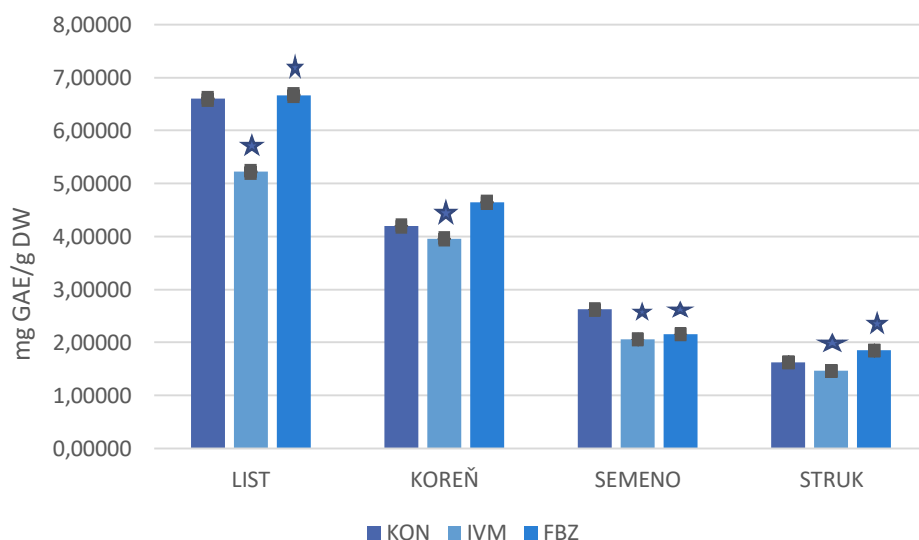
Obr. 17 Porovnanie zmien koncentrácií fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 26.10.2017 po stresovaní 19 dávkami roztokmi IVM a FBZ voči KON

Tabuľka 5 Koncentrácia fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 26.06.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	6,598± 0,021	5,264± 0,025 *	6,679± 0,027 *
Koreň	4,217± 0,021	3,984± 0,019 *	4,608± 0,015
Semeno	2,686± 0,010	2,063± 0,006 *	2,257± 0,004 *
Struk	1,658± 0,004	1,470± 0,003 *	1,914± 0,002 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy ovplyvnené IVM obsahovali o 21 % menej fenolov ako kontrola a obsah fenolických látok v listoch ovplyvnených FBZ sa líšil od kontroly zanedbateľne. Koreň stresovaný IVM vykazoval úbytok fenolických látok o 6 % oproti kontrole a koreň stresovaný FBZ vykazoval nárast fenolov o 10 %. V semenách ovplyvnených IVM sa množstvo fenolov znížilo o 24 % a v semenách ovplyvnených FBZ sa množstvo znížilo o 16 %. Struk stresovaný IVM vykazoval úbytok fenolických látok o 12 % a v struku, ktorý bol stresovaný FBZ došlo k nárastu o 15 % (Tabuľka 5, Obr.18).



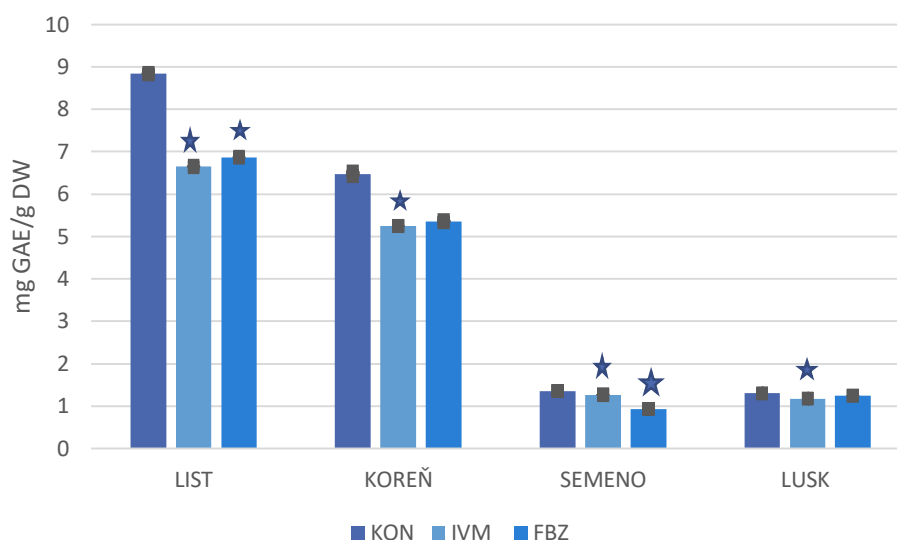
Obr. 18 Porovnanie zmien koncentrácií fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 26.06.2018 po stresovaní 7 dávkami roztokmi IVM a FBZ voči KON

Tabuľka 6 Koncentrácia fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 09.07.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	8,833± 0,022	6,646± 0,013 *	6,867± 0,019 *
Koreň	6,471± 0,059	5,247± 0,020 *	5,357± 0,032
Semenó	1,355± 0,003	1,266± 0,006 *	0,932± 0,003 *
Struk	1,302± 0,002	1,175± 0,001 *	1,242± 0,009

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy ovplyvnené IVM obsahovali o 25 % menej fenolických látok a listy ovplyvnené FBZ obsahovali o 22 % menej fenolov ako kontrola. Pri vzorkách koreňov došlo pri stresovaní rastliny IVM k úbytku o 19 % oproti kontrole a koreň ovplyvnený FBZ obsahoval o 18 % menej ako kontrola. Semená ovplyvnené IVM obsahovali o 7 % menej fenolov ako kontrola a semená ovplyvnené FBZ obsahovali o 32 % menej fenolických látok. Struky stresované IVM vykazovali o 10 % menej fenolických látok a struky stresované FBZ vykazovali o 5 % menej fenolov ako kontrola (Tabuľka 6, Obr.19).



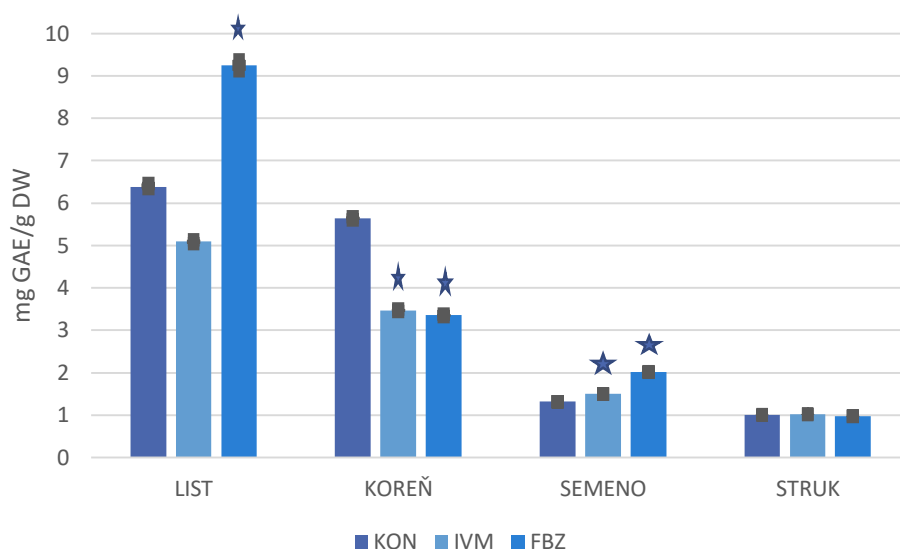
Obr. 19 Porovnanie zmien koncentrácií fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 09.07.2018 po stresovaní 12 dávkami roztokmi IVM a FBZ voči KON

Tabuľka 7 Koncentrácia fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 24.07.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	6,382± 0,075	5,089± 0,040 *	9,244± 0,127 *
Koreň	5,635± 0,043	3,496± 0,031 *	3,356± 0,029 *
Semeno	1,317± 0,002	1,496± 0,003 *	2,019± 0,006 *
Struk	1,000± 0,003	1,021± 0,004	0,975± 0,012

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy stresované IVM obsahovali o 21 % menej fenolov ako kontrola a obsah fenolických látok v listoch ovplyvnených FBZ narástol o 44 % oproti kontrole. Koreň stresovaný IVM vykazoval úbytok fenolických látok o 38 % oproti kontrole rovnako ako koreň stresovaný FBZ, ktorý vykazoval úbytok fenolov o 41 %. V semenách ovplyvnených IVM sa množstvo fenolov zvýšilo o 13 % a v semenách ovplyvnených FBZ sa množstvo zvýšilo o 53 %. Struk stresovaný IVM vykazoval nárast fenolických látok o 2 % a v struku, ktorý bol stresovaný FBZ došlo k úbytku o 3 % (Tabuľka7, Obr.20).



Obr. 20 Porovnanie zmien koncentrácií fenolických látok v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 24.07.2018 po stresovaní 19 dávkami roztokmi IVM a FBZ voči KON

6.2. Koncentrácia celkových flavonoidov

Koncentrácia celkových flavonoidov vo vzorkách bola vyjadrená ako ekvivalent rutinu na hmotnosť sušiny vzorky v g (mg RUT/ g DW). Na určenie štatistickej významnosti zmien sme použili Studentov t-test, $p < 0,05$. Výsledky sú v práci spracované graficky aj numericky.

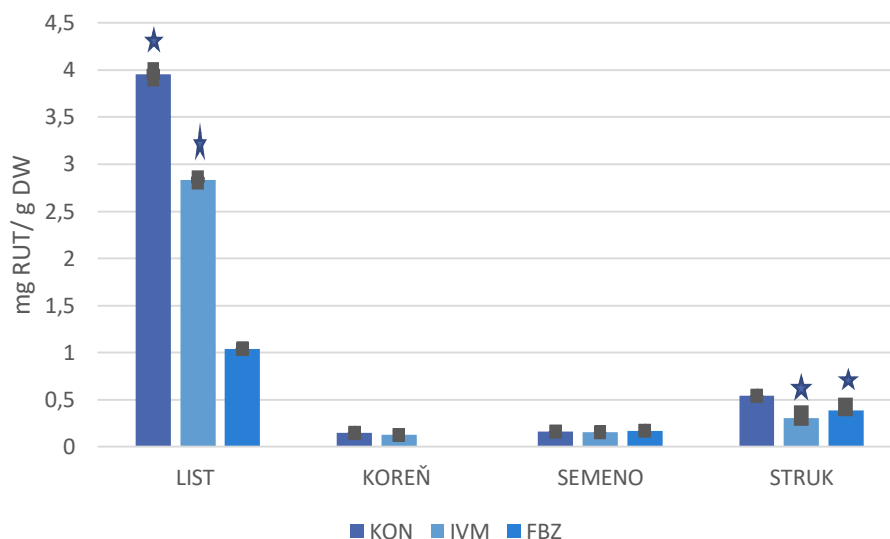
Tabuľka 8 Koncentrácia flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 26.10.2017

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	3,951± 0,057	2,833± 0,031 *	1,042± 0,005 *
Koreň	0,149± 0,003	0,127± 0,001	
Semeno	0,162± 0,004	0,153± 0,003	0,172± 0,001
Struk	0,546± 0,001	0,303± 0,005 *	0,384± 0,004 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy ovplyvnené IVM obsahovali o 29 % menej ako kontrola a listy ovplyvnené FBZ obsahovali o 75 % menej flavonoidov ako kontrola. Koreň stresovaný IVM obsahoval o 15 % menej flavonoidov. Semeno stresované IVM vykazovalo úbytok flavonoidov o 6 % a semeno ovplyvnené FBZ FEN vykazoval nárast flavonoidov o 6 % oproti kontrole.

Struk ovplyvnený IVM obsahoval o 45 % menej flavonoidov ako kontrola a struk stresovaný FBZ obsahoval o 30 % menej flavonoidov (Tabuľka8, Obr.21).



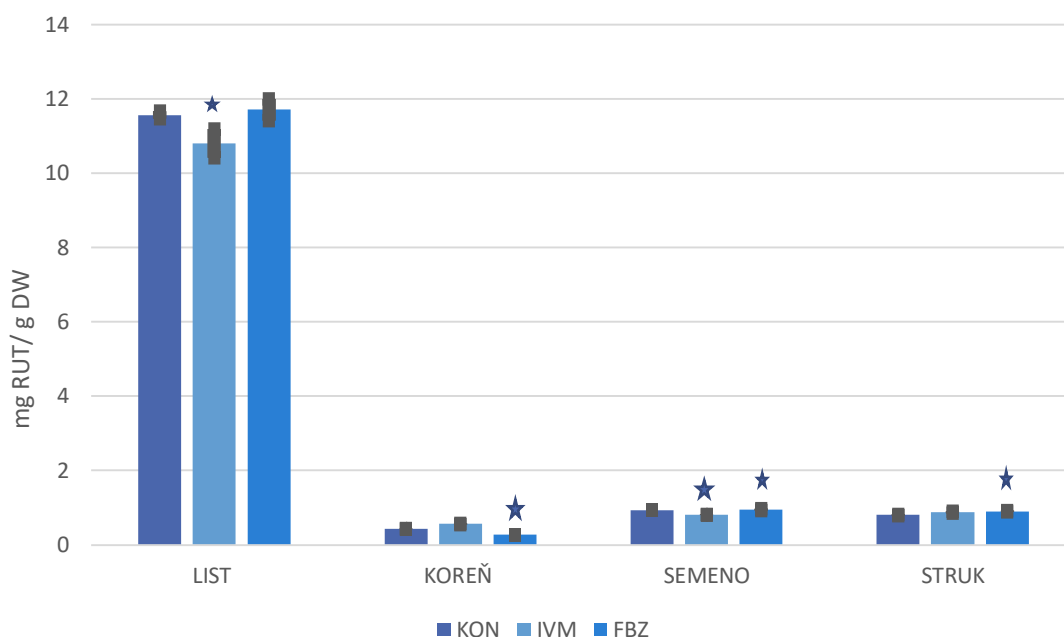
Obr. 21 Porovnanie zmien koncentrácií flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 26.10.2017 po stresovaní IVM a FBZ voči KON

Tabuľka 9 Koncentrácia flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 26.06.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	11,562± 0,010	10,798± 0,038 *	11,709± 0,029
Koreň	0,432± 0,014	0,563± 0,022	0,273± 0,001 *
Semenó	0,938± 0,004	0,817± 0,008 *	0,945± 0,027 *
Struk	0,807± 0,018	0,855± 0,024	0,904± 0,022 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy ovplyvnené IVM obsahovali o 7 % menej flavonoidov a listy ovplyvnené FBZ obsahovali o 2 % menej flavonoidov ako kontrola. Pri vzorkách koreňov došlo pri IVM k nárastu flavonoidov o 30 % oproti kontrole a koreň stresovaný FBZ vykazoval úbytok flavonoidov o 37 % oproti kontrole. Semená ovplyvnené IVM obsahovali o 13 % menej flavonoidov ako kontrola a semená ovplyvnené FBZ naopak obsahovali o 46 % viac flavonoidov. Struky stresované IVM vykazovali o 16 % menej flavonoidov a obsah flavonoidov v semenách stresovaných FBZ bol totožný s obsahom flavonoidov v kontrolnej vzorke (Tabuľka 9, Obr.22).



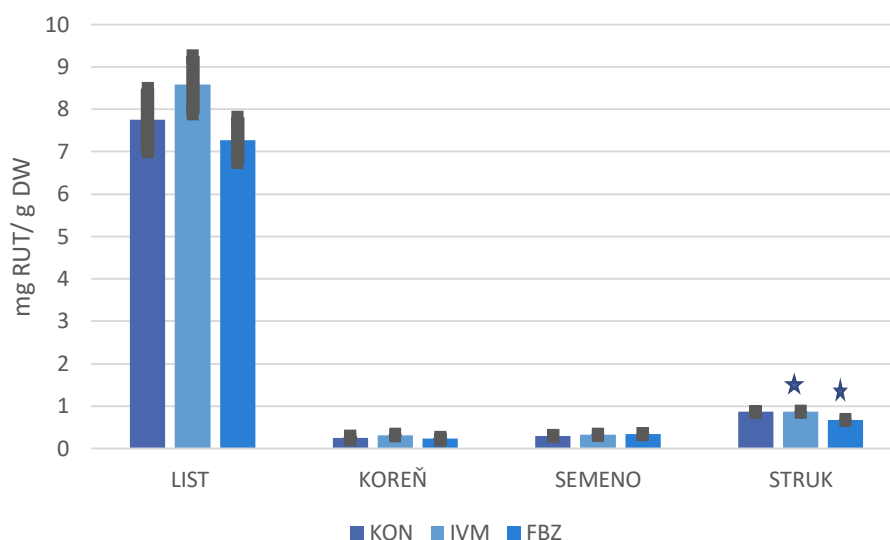
Obr. 22 Porovnanie zmien koncentrácií flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zbieraných 26.06.2018 po stresovaní 7 dávkami roztokmi IVM a FBZ oproti KON

Tabuľka 10 Koncentrácia flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zbieraných 09.07.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	7,748± 0,073	8,578± 0,067	7,277± 0,053
Koreň	0,253± 0,037	0,314± 0,019	0,229± 0,026
Semenó	0,296± 0,001	0,320± 0,008	0,338± 0,004 *
Struk	0,861± 0,005	0,865± 0,006	0,670± 0,005 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy ovplyvnené IVM obsahovali o 10 % menej flavonoidov ako kontrola a obsah flavonoidov v listoch ovplyvnených FBZ bol o 7 % menej voči kontrole. Koreň stresovaný IVM vykazoval nárast flavonoidov o 22 % oproti kontrole a koreň stresovaný FBZ vykazoval úbytok fenolov o 10 %. V semenách ovplyvnených IVM sa množstvo flavonoidov zvýšilo o 8 % a v semenách ovplyvnených FBZ sa množstvo znížilo o 14 %. Koncentrácia flavonoidov v struku stresovanom IVM bol totožný s obsahom flavonoidov v kontrolnej vzorke a v struku, ktorý bol stresovaný FBZ došlo k úbytku flavonoidov o 23 % (Tabuľka 10, Obr.23).



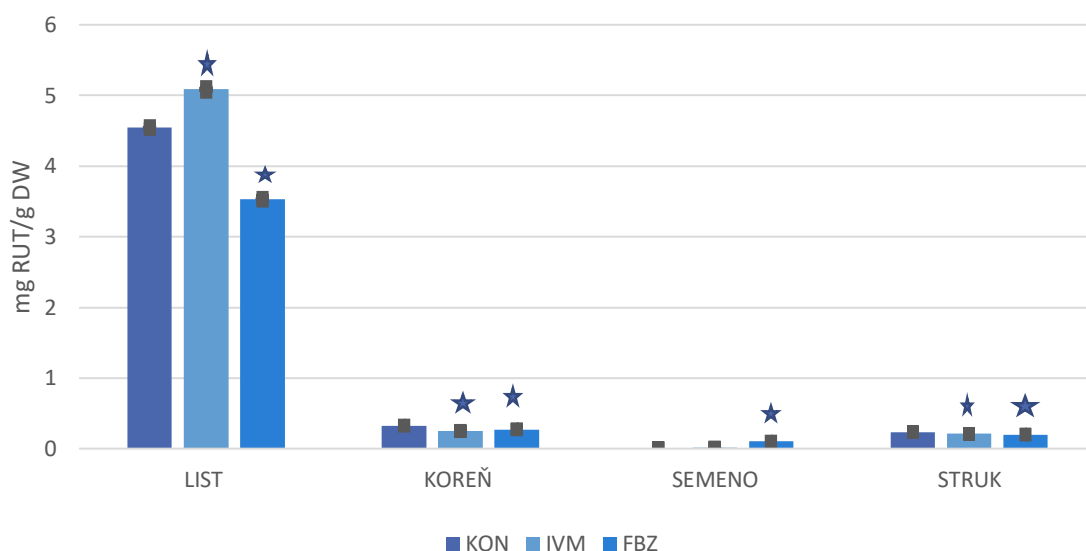
Obr. 23 Porovnanie zmien koncentrácií flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 09.07.2018 stresovaných 12 dávkami roztokmi IVM a FBZ oproti KON

Tabuľka 11 Koncentrácia flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 24.07.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	4,549± 0,021	5,089± 0,035 *	3,531± 0,021 *
Koreň	0,327± 0,002	0,251± 0,001 *	0,274± 0,001 *
Semenó	0,011± 0,003	0,014± 0,004	0,102± 0,003 *
Struk	0,235± 0,001	0,213± 0,001 *	0,199± 0,001 *

Pozn.:* $p \leq 0,05$

Listy ovplyvnené IVM obsahovali o 12 % viac flavonoidov a listy ovplyvnené FBZ obsahovali o 23 % menej flavonoidov ako kontrola. Pri vzorkách koreňov došlo pri stresovaní rastliny IVM k úbytku o 24 % oproti kontrole a koreň ovplyvnený FBZ obsahoval o 17 % flavonoidov menej ako kontrola. Semená ovplyvnené IVM obsahovali o 27 % flavonoidov viac ako kontrola a semená ovplyvnené FBZ obsahovali o 8 % viac flavonoidov ako kontrola. Struky stresované IVM vykazovali o 10 % menej flavonoidov a struky stresované FBZ vykazovali o 16 % menej flavonoidov ako kontrola (Tabuľka 11, Obr.24).



Obr. 24 Porovnanie zmien koncentrácií flavonoidov v listoch, koreňoch, semenách a strukoch zberaných 24.07.2018 stresovaných 19 dávkami roztokmi IVM a FBZ oproti KON

6.3. Koncentrácia izoflavónov

Pomocou HPLC metódy boli analyzované jednotlivé vzorky. Chromatogramy vzoriek boli vyhodnotené na základe retenčných časov izoflavónov, ktoré odpovedali štandardom a pomocou absorbancií z nameraných kalibrácií. Takýmto spôsobom boli detekované píky glykozylovaných izoflavónov daidzinu, glycitinu, genistinu, a taktiež aglykony daizeinu, glyciteinu a genisteinu. Následne sme stanovili ich koncentráciu. V tabuľkách je uvedená len časť nameraných hodnôt, zvyšné hodnoty neuvádzame, pretože koncentrácie boli pod hranicou detekcie.

Tabuľka 12 Koncentrácia glycitinu, daidzeinu a daidzinu v stonke a koreni *in vitro* vzoriek zberaných 17.06.2018

Rastlinná časť	Glycitin (mg/l)	Daidzein (mg/l)	Daidzin (mg/l)
KON stonka	0,648	–	–
IVM stonka	0,953	–	0,547
FBZ stonka	0,146	0,448	0,107
KON koreň	1,097	1,161	2,778
IVM koreň	1,731	0,325	1,550
FBZ koreň	–	0,778	1,058

Pozn.: – koncentrácia bola pod hranicou detekcie

Stonka stresovaná IVM obsahovala o 47 % viac glycitínu ako KON a stonka stresovaná FBZ obsahovala o 78 % menej glycitínu ako KON. Koreň ovplyvnený IVM obsahoval o 57 % viac glycitínu ako KON, zároveň obsahoval o 73 % menej daidzeínu a o 45 % menej daidzínu ako KON. Koreň stresovaný FBZ vykazoval o 33 % menej daidzeínu ako kontrola a o 62 % menej daidzínu ako kontrola (Tabuľka 12).

Tabuľka 13 Koncentrácia glycitínu a daidzínu v listoch zberaných 22.9.2017 a 13.10.2017

Rastlinná časť	Glycitin (mg/l)	Daidzin (mg/l)
KON list 22.9.	1,598	0,328
IVM list 22.9.	1,415	0,384
FBZ list 22.9.	2,858	0,556
KON list 13.10.	1,568	0,252
IVM list 13.10.	1,334	–
FBZ list 13.10.	1,032	0,576

Pozn.: – koncentrácia bola pod hranicou detekcie

List zberaný 22.09.2017 stresovaný IVM obsahoval o 12 % menej glycitínu ako kontrola a o 17 % viac daidzínu. Pri liste zberanom 22.09.2017 stresovanom FBZ došlo k nárastu glycitínu o 78 % a nárastu koncentrácie daidzínu o 70 %. List zberaný 13.10.2017 stresovaný IVM obsahoval o 15 % menej glycitínu ako kontrola. List ovplyvnený FBZ obsahoval o 35 % menej glycitínu ako kontrola a o 128 % viac daidzínu (Tabuľka 13).

Tabuľka 14 Koncentrácia glycitínu v listoch, strukoch a semenách zberaných 26.10.2017

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	1,510	0,624	0,660
Struk	0,556	0,486	0,372
Semená	0,977	0,594	1,035

List ovplyvnený IVM obsahoval o 59 % menej glyciteínu a list ovplyvnený FBZ obsahoval o 57 % menej glyciteínu ako kontrola. Pri strukoch ovplyvnených IVM došlo k úbytku glyciteínu o 13 % a pri strukoch stresovaných FBZ došlo k úbytku glyciteínu o 34 %. Semená ovplyvnené IVM obsahovali o 40 % menej glyciteínu a semená ovplyvnené FBZ obsahovali o 5 % viac glyciteínu ako kontrola (Tabuľka 14).

Tabuľka 15 Koncentrácia daidzeinu a daidzinu v koreňoch a listoch zberaných 26.10.2017

Rastlinná časť	Daidzein (mg/l)	Daidzin (mg/l)
KON koreň	2,175	–
IVM koreň	1,588	–
IVM semeno	0,473	1,786
FBZ semeno	1,530	7,138

Pozn.: – koncentrácia bola pod hranicou detekcie

Koreň ovplyvnený IVM obsahoval o 27 % menej daidzeinu ako kontrolný koreň (Tabuľka 15).

Tabuľka 16 Koncentrácie daidzeinu a daidzinu v listoch a koreňoch zberaných 26.06.2018

Rastlinná časť	Daidzein (mg/l)	Daidzin (mg/l)
KON list	–	1,017
IVM list	–	0,882
FBZ list	–	0,872
KON koreň	61,265	3,819
IVM koreň	26,405	2,626
FBZ koreň	64,027	4,200

Pozn.: – koncentrácia bola pod hranicou detekcie

Koreň stresovaný IVM obsahoval o 61 % menej daidzeinu ako kontrola a koreň stresovaný FBZ obsahoval o 4 % viac daidzeinu. Koreň stresovaný IVM obsahoval o 32 % menej daidzinu a koreň ovplyvnený FBZ obsahoval o 9 % viac daidzinu ako kontrola. V liste ovplyvnenom IVM došlo k úbytku daidzinu o 14 %, a pri stresovaní FBZ k úbytku o 15 % (Tabuľka 16).

Tabuľka 17 Koncentrácia glycitínu (mg/l) v listoch a strukoch zberaných 26.06.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	7,665	7,343	11,686
Struk	3,737	1,802	1,769

V liste ovplyvnenom IVM došlo k úbytku glycitínu o 5 % a v liste ovplyvnenom FBZ došlo k nárastu glyciteínu o 52 %. V struku stresovanom IVM sa znížil obsah glyciteínu o 52 % a v struku stresovanom FBZ sa obsah glyciteínu znížil o 53 % (Tabuľka 17).

Tabuľka 18 Koncentrácia daidzeinu a daidzinu v koreňoch zberaných 09.07.2018

Rastlinná časť	Daidzein (mg/l)	Daidzin (mg/l)
KON koreň	21,489	0,728
IVM koreň	10,099	0,642
FBZ koreň	20,484	0,701

Koreň stresovaný IVM obsahoval o 54 % menej daidzeinu a o 12 % menej daidzinu ako kontrola. Koreň stresovaný FBZ obsahoval o 5 % menej daidzeinu a o 4 % menej daidzinu ako kontrola (Tabuľka 18).

Tabuľka 19 Koncentrácia glycitínu (mg/l) v listoch a strukoch zberaných 09.07.2018

Rastlinná časť	KON	IVM	FBZ
List	1,103	1,325	1,862
Struk	0,645	0,525	0,580

Pri liste stresovanom IVM došlo k nárastu glycitínu o 20 % a pri liste stresovanom FBZ došlo k nárastu glycitínu o 69 % oproti kontrole. V struku stresovanom IVM sa obsah glycitínu znížil o 19 % a obsah glycitínu v struku stresovanom FBZ sa znížil o 10 % (Tabuľka 19).

Tabuľka 20 Koncentrácie daidzeinu a daidzinu v koreňoch zberaných 24.07.2018

Rastlinná časť	Daidzein (mg/l)	Daidzin (mg/l)
KON koreň	9,786	0,301
IVM koreň	5,189	0,223
FBZ koreň	10,316	0,314

V koreni stresovanom IVM došlo k úbytku daidzeinu o 47 % a k úbytku daidzinu o 26 %. V koreni ovplyvnenom FBZ došlo k zvýšeniu obsahu daidzeinu o 5 % a k zvýšeniu obsahu daidzinu o 4 % (Tabuľka 20).

7. DISKUSIA

Anthelmintiká sa v súčasnosti stávajú závažným environmentálnym rizikom. Vo veľkej miere sa používajú na terapiu a profylaxiu hospodárskych zvierat, ktoré ich vylučujú do životného prostredia, odkiaľ sa môžu dostávať do rastlín, ale aj do živočíšnych alebo ľudských organizmov (Bártíková et al. 2016). Rastliny sú schopné veterinárne liečivá absorbovať, transformovať na menej toxické zlúčeniny a uchovávať ich vo svojich vakuolách a bunkových stenách. Táto schopnosť chráni nielen rastliny, ale aj bezstavovce a bylinožravce (Bártíková et al. 2015). Uchovávanie anthelmintík v rastlinách sa cielene využíva pri fytoimediačných metódach, ktorých cieľom je odstránenie alebo degradácia kontaminantov (Paz-Alberto a Sigua 2013). Veľkým otáznikom však je akým spôsobom anthelmintiká a ich metabolity ovplyvňujú rastlinný organizmus, a to či sú pre rastliny prospešné alebo škodlivé.

Naším skúmaným materiálom boli rastliny sóji fazuľovej (*Glycine max*), ktoré vo svojich štruktúrach obsahujú bioaktívne fytochemikálie, kam sa zaraďujú napr. izoflavóny, fenoly, saponíny a pod (Kim et al. 2013). V sóji fazuľovej sa vo veľkom množstve nachádzajú fenolické látky, ktoré majú vo svojej štruktúre hydroxylovú skupinu (OH^-), ktorá pôsobí silne antioxidačne, účinne degraduje superoxidový aniónový radikál a inhibuje lipidovú peroxidáciu (Srinivasan et al. 2007). Väčšiu polovicu z fenolických látok tvoria flavonoidy, ktoré majú taktiež pozitívny účinok na organizmus, pôsobia protizápalovo, antihepatotoxicky a sú silnými antioxidantami so schopnosťou zachytávať voľné radikály (Narayana et al. 2001).

Liečivá sú biologicky aktívne zlúčeniny, ktoré sú navrhnuté tak aby interagovali s cieľovými molekulami v organizme ľudí alebo zvierat, v prostredí však môžu ovplyvňovať aj iné organizmy, ktoré môžu reagovať inými spôsobmi. (Gunnarsson et al. 2008) Okrem bezstavovcov a vodných živočíchov, aj rastliny môžu prijímať liečivá, ktoré metabolizujú prostredníctvom biotransformačných enzýmov (Stuchlíková et al. 2016). Liečivá sa takýmto spôsobom ukladajú do vakuol alebo bunkových stien. Aj napriek tomu väčšina štúdií sledovala účinok liečiv na zvieratá a mikroorganizmy, a len veľmi málo štúdií sa venuje ich účinku na rastliny (Bártíková et al. 2015). V našej práci sme preto sledovali aký účinok majú anthelmintiká- fenbendazol a ivermektín na koncentráciu fenolických látok, flavonoidov a izoflavónov- genisteinu, glyciteinu, daidzeinu a ich glykolyzovaných prekursorov genistinu, glycitinu a daidzinu v rastline sóji fazuľovej. Pre

splnenie našich cieľov bolo potrebné vypestovanie sóji fazuľovej a jej stresovanie s anthelmintikami a následné spracovanie rastlinného materiálu.

Pre plnohodnotné spracovanie vzoriek a stanovenie sledovaných látok bolo potreba navážiť minimálne 0,1 g rastlinného materiálu. U vzoriek získaných so zberov v čase 26.10.2017, 26.06.2018, 09.07.2018 a 24.07.2018 bolo tohto množstva dostatok a tak nebol problém so spracovaním a s následným meraním vybraných látok. Množstvo vzoriek zo dňa 17.06.2018, 22.09.2017 a 13.10.2017 bolo naopak veľmi málo a preto sa tomu prispôbovalo aj meranie, kedy sú pri niektorých vzorkách merané len časti skúmaných látok. Aj napriek tomu však boli niektoré koncentrácie pri meraní pod hranicou detekcie.

Porovnaním výsledkov nášho experimentu bolo zistené ako anthelmintiká ovplyvňujú koncentrácie fenolických látok, flavonoidov a vybraných izoflavónov.

V súčasnosti nie je veľa štúdií, ktoré by sa zaoberali fytotoxicitou anthelmintík. V našej práci sme na stanovenie koncentrácie celkových fenolických látok použili metódu Folin-Ciocalteu a výsledky sme vyjadrovali ako ekvivalent kyseliny gallovej v mg GAE/g sušiny. Szotáková et. al. (2017) uvádza, že rastliny skorocelu ovplyvnené fenbendazolom, vykazujú vyššiu koncentráciu prolínu vo svojich štruktúrach ako kontrolné rastliny. V našich vzorkách sa v kontrolných rastlinných listoch namerala priemerná hodnota fenolických látok $6,046 \pm 0,03$ mg GAE/ g DW, v listoch rastliny ovplyvnenej ivermektínom sme namerali koncentráciu fenolických látok $4,772 \pm 0,03$ mg GAE/ g DW, čiže sledujeme úbytok. V listoch ovplyvnených fenbendazolom došlo naopak k nárastu fenolických látok, namerali sme koncentráciu $6,460 \pm 0,04$ mg GAE/ g DW.

V koreňoch kontrolných skúmaných rastlín sme zistili koncentráciu fenolických látok $5,479 \pm 0,029$. Podľa Otles a Yalcin (2012) fenolické hodnoty v rastline *Urtica dioica* majú najvyššiu hodnotu v liste a následne v koreňoch, pričom ich používanie v liečiteľstve v podobe čajov výrazne znižuje ich koncentráciu. Vo vzorkách koreňov stresovaných ivermektínom došlo k úbytku fenolických látok, nameraním priemerných hodnôt $3,361 \pm 0,02$ a korene stresované fenbendazolom vykazujú taktiež úbytok fenolických látok, nameraním priemerných hodnôt $4,927 \pm 0,02$. Podľa našich meraní tak anthelmintiká znižujú koncentráciu celkových fenolov v koreňoch rastliny.

Výsledky Malencić et al. (2007) týkajúce sa výťažkov sójových semien podľa nich naznačujú, že obsah fenolov by mal byť považovaný za dôležitý znak obsahu sójových bôbov, okrem obsahu proteínov a olejových zložiek. V našich kontrolných vzorkách sme namerali množstvo fenolov s priemernou hodnotou $2,383 \pm 0,006$. Sójové semená stresované ivermektínom vykazujú znížený obsah celkových fenolov, priemerná nameraná

hodnota bola $2,137 \pm 0,006$. U semien sóji, ktoré boli stresované fenbendazolom došlo k nárastu obsahu celkových fenolov s priemernou nameranou hodnotou $2,829 \pm 0,01$. Sójové bôby sú považované za „zdravé potraviny“ a niektoré ich farmakologické účinky možno pripísať práve prítomnosti fenolických zlúčenín.

Význam informácií o koncentrácii fenolických látok v sójových strukoch je dôležitý pretože sa používajú ako krmivo pre hospodárske zvieratá. V kontrolných strukoch sóji sme namerali priemernú hodnotu celkových fenolických látok $1,745 \pm 0,005$. Pričom struky stresované ivermektínom vykazovali úbytok celkových fenolov, s priemernou nameranou hodnotou $1,563 \pm 0,003$, taktiež ako struky stresované fenbendazolom, kedy došlo k úbytku v koncentrácii celkových fenolických látok, s priemernou nameranou hodnotou $1,503 \pm 0,006$.

Na stanovenie koncentrácie celkových flavonoidov sme použili kolorimetrickú metódu s chloridom hlinitým a dusitanom sodným a výsledok sme vyjadrili ako mg ekvivalentu rutinu na g sušeného rastlinného materiálu v mg RUT/ g sušiny.

Graham (1991) skúmali distribúciu flavonoidov, izoflavónov a ich metabolitov v sójových strukoch, semenách a koreňoch. Ich namerané hodnoty naznačujú, že flavonoidy a izoflavóny spolu tvoria prevažnú väčšinu (80-90%) rozpustných aromatických metabolitov v týchto tkanivách. V sójových listoch sme namerali priemernú hodnotu celkových flavonoidov $5,562 \pm 0,2$. Sójové listy ovplyvnené oboma anthelmintikami vykazovali menšiu koncentráciu, koncentrácia flavonoidov listoch, ktoré boli ovplyvnené ivermektínom bola $5,459 \pm 0,2$ a v listoch, ktoré boli stresované fenbendazolom bola priemerná nameraná hodnota $4,712 \pm 0,2$.

Josipovic et al. (2016) uvádzajú, že v sójových semenách namerali priemerné hodnoty flavonoidov $0,41$ mg CAE (ekvivalent katechínu) /g DW. V sójových semenách použitých ako kontrola sme namerali koncentráciu celkových flavonoidov $0,352 \pm 0,003$, pri stresovaní ivermektínom sa obsah celkových flavonoidov znížil, s celkovou priemernou nameranou hodnotou $0,326 \pm 0,006$. Stresovaním rastlín sóji sa obsah flavonoidov v semenách mierne zvýšil s priemernou nameranou hodnotou $0,389 \pm 0,009$. V strukoch, ktoré slúžia ako zdroj potravy najmä pre hospodárske zvieratá sme namerali v kontrole obsah celkových flavonoidov $0,613 \pm 0,007$. Ovplyvnenie rastlín ivermektínom viedlo k zníženiu obsahu flavonoidov v struku na priemernú nameranú hodnotu $0,567 \pm 0,008$ a ovplyvnenie fenbendazolom znížilo obsah flavonoidov na priemernú nameranú hodnotu $0,539 \pm 0,008$.

Koreňové flavonoidy hrajú významnú úlohu pri ochrane rastlín pred škodcami a chorobami, pôsobia antioxidačne, regulujú rast a funkcie koreňov, a predstavujú zdroj liečivých látok. (Rao, 1990) V kontrolnej vzorke koreňov sme namerali priemernú hodnotu flavonoidov $0,291 \pm 0,01$. Stresovanie ivermektínom zvýšilo ich obsah na priemernú hodnotu $0,314 \pm 0,01$ a stresovanie fenbendazolom naopak ich koncentráciu znížilo, priemerná nameraná hodnota bola $0,259 \pm 0,009$.

Pri porovnaní vzoriek zo zberov z roku 2017 môžeme vidieť, že čím viac dlhšie boli rastliny sóji stresované, tým vyššia bola koncentrácia celkových fenolických látok v listoch. Vo vzorkách zberaných v roku 2018 sa koncentrácia fenolických látok v listoch a koreňoch pri druhom zbere zvýšila, ale u semien a strukov došlo k zníženiu obsahu fenolických látok pri dlhšom stresovaní anthelmintikami. Pri porovnaní prvého a tretieho zberu došlo k úbytku koncentracii fenolických látok, čo mohlo byť spôsobené tým, že rastliny boli v čase tohto zberu už suché.

Dĺžka stresovania rastlín anthelmintikami má vplyv na koncentráciu celkových flavonoidov. Pri vzorkách z roku 2018 môžeme pozorovať jasne viditeľné zníženie koncentracii flavonoidov vo všetkých vzorkách, či už išlo o ovplyvnenie ivermektínom alebo fenbendazolom. Pri rastlinách stresovaných ivermektínom z druhého zberu došlo k zníženiu o 23% oproti prvému zberu, pri treťom to bolo zníženie flavonoidov až o 68%. Rastliny stresované fenbendazolom v druhom zbere obsahovali o 39% menej flavonoidov, a v treťom zbere došlo k ich zníženiu o 71 % oproti prvému zberu.

Genistein, daidzein, glycitein a ich glykozidy sú hlavnými izoflavónmi identifikovanými v sóji fazuľovej. Podľa Ho et al. (2002) celkový genistein a daidzein predstavujú približne 0,2% z hmotnosti suchého sójového semena. Autori uvádzajú, že v listoch sóji namerali najvyššiu koncentráciu genistinu a sójové listy obsahovali v najväčšom množstve genistin, daidzin, genistein a daidzein. V našich vzorkách sme naopak nenamerali takmer žiadne hodnoty genisteinu a genistinu, ktorých hodnoty sa nachádzali pod hranicou detekcie. Sójové listy obsahovali väčšie množstvo daidzeinu, daidzinu a následne glycitinu. Sójové semená mali najvyššiu nameranú koncentráciu glycitinu, daidzinu a daidzeinu.

Z dôvodu koncentrácie izoflavónov vo vzorkách pod hranicou detekcie sme získali malé množstvo informácií o koncentráciách vybraných izoflavónov a preto nie je možné zistiť ako ovplyvňujú anthelmintiká ivermektín a fenbendazol ich koncentráciu. Podľa

Chung et al. (2012) koncentráciu jednotlivých izoflavónov ovplyvňuje ich genetické pozadie (typ kultivaru), rastové prostredie (miesto pestovania, metóda) a podmienky spracovania (pH, teplota, deformácia, tlak).

Na základe nameraných výsledkov dedukujeme, že ivermektín aj fenbendazol majú vplyv na koncentráciu fenolických látok. Vzorky ovplyvnené ivermektínom aj fenbendazolom vykazujú zníženie obsahu fenolických látok. Nemôžeme jednoznačne potvrdiť, či anthelmintiká ivermektín a fenbendazol obsah flavonoidov znižujú alebo zvyšujú pretože, v niektorých častiach rastliny zvýšili ich koncentráciu a v niektorých naopak koncentráciu flavonoidov znížili. Ovplyvnenie koncentrácie vybraných izoflavónov z dôvodu ich nízkej koncentrácie pod hranicou detekcie nemôžeme posúdiť.

8. Záver

Zistili sme :

- anthelmintiká- ivermektín a fenbendazol ovplyvňujú koncentráciu fenolických látok v sóji fazuľovej (v listoch, koreňoch, semenách a strukoch)
 - vo vzorkách ovplyvnených ivermektínom došlo v 85 % prípadov k zníženiu koncentrácie celkových fenolických látok
 - vo vzorkách ovplyvnených fenbendazolom došlo v 60 % prípadov k zníženiu obsahu celkových fenolov a v 40 % k zvýšeniu koncentrácie celkových fenolických látok
- anthelmintiká- ivermektín a fenbendazol ovplyvňujú koncentráciu celkových flavonoidov v sóji fazuľovej
 - vo vzorkách ovplyvnených ivermektínom došlo v 50 % k nárastu obsahu flavonoidov a v 50 % k úbytku obsahu celkových flavonoidov
 - vo vzorkách stresovaných fenbendazolom došlo v 60 % k nárastu obsahu celkových flavonoidov a v 40 % k úbytku
- väčšina vybraných izoflavónov mala koncentráciu pod hranicou detekcie, čiže nebolo možné posúdiť účinok ivermektínu a fenbendazolu na ich koncentráciu

9. Zoznam skratiek

AGE	konečné produkty pokročilej glykácie
ARE	antioxidačný responzibilný element
DAD	detektor fotodiódového poľa
DMSO	dimetylsulfoxid
DW	sušina, z angl. dry weight
ER	estrogénové receptory
FEN	fenbendazol
FLD	fluorimetrický detektor
GAE	ekvivalent kyseliny gallovej
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IFS	izoflavón syntázy
IVM	ivermektín
Keap 1	represorický proteín; z angl. Kelch-like ECH associated protein
KON	kontrola
Nrf2	nukleárny faktor; z angl. Nuclear factor E2-related factor 2
ROS	reaktívne druhy kyslíka
RUT	rutin
UV-VIS	ultrafialovo-viditeľná spektrofotometria
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

10. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- AHALYA, N. a T.V. RAMACHANDRA, 2006. Phytoremediation : Processes and Mechanisms. *Journal of Ecobiology*. 2006, roč. 18, č. 1, s. 33–38.
- BANERJEE, S., LI, Y., WANG, Z., 2008. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer letters*. 2008, roč. 269, č. 2, s. 226–42. ISSN 1872-7980.
- BARKU, V.Y., OPOKU-BOAHEN, Y., OWUSU-ANSAH, E., 2013. Antioxidant activity and the estimation of total phenolic and flavonoid contents of the root extract of *Amaranthus spinosus*. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2013, roč. 3, č. 1, s. 69–74. ISSN 2249-7412.
- BÁRTÍKOVÁ, H., PODLIPNÁ, R., SKÁLOVÁ, L., 2016. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*. 2016, roč. 144, s. 2290–2301. ISSN 18791298.
- BÁRTÍKOVÁ, H., SKÁLOVÁ, L., STUHLÍKOVÁ, L., VOKŘÁL, I., VANĚK, T., PODLIPNÁ, R., 2015. Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug Metabolism Reviews*. 2015, roč. 47, č. 3, s. 374–387. ISSN 10979883.
- BOXALL, A., KOLPIN, B., HOLLING-SORENSEN, B., TOLLS, J., 2003. Are veterinary medicines causing enviromental risks? *Enviromental sciene and technology*. 2003, s. 286–294.
- CHUNG, I.L., SEO, H.M., INMYOUNG, P., 2012. Changes in isoflavone composition of soya seeds, soya curd and soya paste at different processing conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2012, roč. 51, č. 1, s. 40–51. ISSN 1336-8672.
- COOPER, E., YAMAGUCHI, N., 2004. *Complementary and Alternative Approaches to Biomedicine*. New York: Plenum Piublisher. ISBN 978-0306482885.
- DIXON, R.A., FERREIRA, D., 2002. Genistein. *Phytochemistry* . 2002, roč. 60, č. 3, s. 205–211. ISSN 0031-9422.
- DOLEŽALOVÁ, V., 1995. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. vydanie. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-198-5.
- DONG, M.V., 2006. *Modern HPLC for practicing scientists*. New Yersey: Jon Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-471-72789-7.
- DUCHÁČEK, L., LAMKA, J., 2014. *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. B.m.: Karolinum Press. ISBN 9788024627922.
- EL-KORDY, E. A., ALSHAHRANI, A.M., 2015. Effect of genistein, a natural soy isoflavone, on pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats: Histological and immunohistochemical study. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2015, roč. 3, č. 3, s. 108–119.

ETIM, E. E., 2012. Phytoremediation and Its Mechanisms: A Review. *National Journal of Environment and Bioenergy*. 2012, roč. 2, s. 120–136.

FAIT, T., 2013. *Klimakterická medicína*. 2. vydanie. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-342-8.

FERREYRA, F., RIUS, S.P., CASATI, P., 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*. 2012, roč. 3, s. 222. ISSN 1664-462X.

FURINI, A., MANAR, A., DALCORO, A., 2015. Editorial: Environmental phytoremediation: plants and microorganisms at work. *Frontiers in plant science*. 2015, roč. 6, s. 520. ISSN 1664-462X.

GARCIA-RODRÍGUEZ, A., MATAMOROS, V., FONTÀS, C., SALVADÓ, V., 2014. The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants—a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014, roč. 21, č. 20, s. 11708–11728. ISSN 0944-1344.

GERMAINE, K.J., BYRNE, J., LIU, X., 2014. Ecopiling: a combined phytoremediation and passive biopiling system for remediating hydrocarbon impacted soils at field scale. *Frontiers in plant science*. 2014, roč. 5, s. 756. ISSN 1664-462X.

GRAHAM, T. L., 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant physiology*. 1991, roč. 95, č. 2, s. 594–603. ISSN 0032-0889.

GRØNVOLD, J., SVENDSEN, T.S., KRAGLUND, H., 2004. Effect of the antiparasitic drugs fenbendazole and ivermectin on the soil nematode *Pristionchus maupasi*. *Veterinary Parasitology*. 2004, roč. 124, č. 1–2, s. 91–99. ISSN 0304-4017.

GUNNARSSON, L., JAUHIAINEN, A., KRISTIANSSON, E., 2008. Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. *Environmental Science & Technology*. 2008, roč. 42, č. 15, s. 5807–5813. ISSN 0013-936X.

HARMANTHA, J., 2005. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylypropanoidů. *Chernické listy*. 2005, č. 99, s. 622–632.

HO, H.M., CHEN, R.Y., LEUNG, L.K., 2002. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002, roč. 56, č. 6, s. 289–295. ISSN 0753-3322.

HOLDEN-DYE, L., WALKER, R.J., 2014. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. 2014, s. 1–29. ISSN 15518507.

HOUBA, M., 2011. *Metodika pěstování sóji luštinaté: certifikovaná metodika*. Šumperk: Agritec. ISBN 978-80-87360-03-3.

JAHODÁŘ, L., 2006. *Farmakobotanika - semenné rostliny*. Praha: Karolinum. ISBN 8024612259.

JAIN, R.K., JOSHI, A., CHAUDHARY, H.R., 2017. Study on genetic variability, heritability and genetic advance in Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *LEGUME RESEARCH - AN INTERNATIONAL JOURNAL*. 2017, . ISSN 0976-0571.

JI, S., WILLIS, G.M., FRANK, G.R., 1999. Soybean Isoflavones, Genistein and Genistin, Inhibit Rat Myoblast Proliferation, Fusion and Myotube Protein Synthesis. *The Journal of Nutrition*. 1999, roč. 129, č. 7, s. 1291–1297. ISSN 0022-3166.

JOANNOU, G. E., KELLY, G.E., REEDER, A.Y., 1995. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1995, roč. 54, č. 3–4, s. 167–84. ISSN 0960-0760.

JOSIPOVIC, A., SUDAR, R., SUDARIC, A., 2016. Total phenolic and total flavonoid content variability of soybean genotypes in eastern Croatia. *Croatian Journal of Food Science and Technology*. 2016, roč. 8, č. 2, s. 60–65. ISSN 18473466.

KIM, S.L., LEE, J.E., KWON, Y.U., 2013. Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. *Food Chemistry*. 2013, roč. 136, č. 2, s. 491–500. ISSN 0308-8146.

KLAASSEN, C., 2013. *Casarett & Doull's Toxicology*. B.m.: McGraw-Hill Professional.

KUIPER, G.G.J.M., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B. 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology*. 1998, roč. 139, č. 10, s. 4252–4263. ISSN 0013-7227.

KUMAR, R.R., LEE, J.T., CHO, J.Y., 2012. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2012, roč. 55, č. 6, s. 701–709. ISSN 17382203.

KUMAR, S., PANDEY, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal*. 2013, roč. 2013, s. 162750. ISSN 1537-744X.

KÜMMERER, K., 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. 2009, roč. 90, č. 8, s. 2354–2366. ISSN 0301-4797.

LAMKA, J., DUCHÁČEK, L., 2014. *VETERINÁRNÍ LÉČIVA pro posluchače farmacie*. 2014. ISBN 978-802-4627-908.

LAURENT, F., CANLET, C., DEBRAUWER, L., 2007. Metabolic fate of [14c]-2,4-dichlorophenol in tobacco cell suspension cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007, roč. 26, č. 11, s. 2299. ISSN 0730-7268.

- LEE, E.J., KIM, S.Y., HYUN, J.W., 2010. Glycitein inhibits glioma cell invasion through down-regulation of MMP-3 and MMP-9 gene expression. *Chemico-Biological Interactions*. 2010, roč. 185, č. 1, s. 18–24. ISSN 00092797.
- LEE, J.H., 2013. An overview of phytoremediation as a potentially promising technology for environmental pollution control. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2013, roč. 18, č. 3, s. 431–439. ISSN 1226-8372.
- LEHMAN, P.K., GELLER, S.E., 2004. Behavior analysis and environmental protection: accomplishments and potential for more. *Behavior and Social Issues*. 2004, roč. 13, č. 1, s. 13–32. ISSN 1064-9506.
- MALENCIĆ, D., POPOVIĆ, M., MILADINOVIĆ, J., 2007. Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2007, roč. 12, č. 3, s. 576–81. ISSN 1420-3049.
- MALVIYA, R., BANSAL, V., SHARMA, P.K., 2009. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2009, roč. 2, č. 5, s. 22–26.
- MASAROVIČOVÁ, E., REPČÁK, M., ERDELSKÝ, K., GAŠPARÍKOVÁ, O., JEŠKO, T., MISTRÍK, I., 2002. *Fyziológia rastlín*. Bratislava: Vydavateľstvo Univerzity Komenského. ISBN 80-223-1615-6.
- MASILAMANI, M., WEI, J., SAMPSON, H.S., 2012. Regulation of the immune response by soybean isoflavones. *Immunologic Research*. 2012, roč. 54, č. 1–3, s. 95–110. ISSN 0257-277X.
- MIERZIAK, J., KOSTYN, K., KULMA, A., 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014, roč. 19, č. 10, s. 16240–65. ISSN 1420-3049.
- NARAYANA, R., SRIPAL, M., CHALUVADI, M.R., , 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 2001, roč. 33, s. 2–16.
- NOLLET, L.M.L., RATHORE, H.S., 2015. *Biopesticides Handbook*. Boca Raton. B.m.: CRC Press.
- NOVÁKOVÁ, L. a kolektív, 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. ISBN 987-80-260-4243-3.
- OTLES, S., YALCIN, B., 2012. Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *The Scientific World Journal*. 2012, roč. 2012, s. 1–12. ISSN 1537-744X.
- PADMAVATHIAMMA, P.K., LI, P.Y., 2007. Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2007, roč. 184, č. 1–4, s. 105–126.

- PAN, W., IKEDA, K., TAKEBE, M., YAMORI, Y., 2001. Genistein, Daidzein and Glycitein Inhibit Growth and DNA Synthesis of Aortic Smooth Muscle Cells from Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *The Journal of Nutrition*. 2001, roč. 131, č. 4, s. 1154–1158. ISSN 0022-3166.
- PAZ-ALBERTO, A. M., SIGUA, G.C., 2013. Phytoremediation: A Green Technology to Remove Environmental Pollutants. *American Journal of Climate Change*. 2013, roč. 2, s. 71–86.
- PRABAKARAN, M., LEE, J. H., ATEEQUE A., 2018. Effect of Storage Time and Temperature on Phenolic Compounds of Soybean (*Glycine max* L.) Flour. *Molecules*. 2018, roč. 23, č. 9, s. 2269.
- PRASAIN, J.K., WANG, CH. CH., BARNES, S.Y., 2004. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004, roč. 37, č. 9, s. 1324–1350. ISSN 0891-5849.
- RAHMAN MAZUMDER, M., A., HONGSPRABHAS, P., 2016. Genistein as antioxidant and antibrowning agents in in vivo and in vitro: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016, roč. 82, s. 379–392. ISSN 0753-3322.
- RAJAN, R.K., BALAJI, S.M.B., 2017. Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharmaceutical biology*. 2017, roč. 55, č. 1, s. 242–251. ISSN 1744-5116.
- RAO, A.S., 1990. Root flavonoids. *The Botanical Review*. 1990, roč. 56, č. 1, s. 1–84. ISSN 0006-8101.
- RAPPOPORT, Z., 2003. *The Chemistry of Phenols 2*. First edit. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 0471497371.
- ROMANI, A., VIGNOLINI, P., GALARDI, C., 2003. Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003, roč. 51, č. 18, s. 5301–6. ISSN 0021-8561.
- ROWLAND, I., FAUGHNAN, M., HOEY, L., 2003. Bioavailability of phyto-oestrogens. *British Journal of Nutrition*. 2003, roč. 89, č. 5, s. 838–852. ISSN 14752662.
- RUSSO, M., RUSSO, G.L., DAGLIA, M., 2016. Understanding genistein in cancer: The “good” and the “bad” effects: A review. *Food Chemistry*. 2016, roč. 196, s. 589–600. ISSN 0308-8146.
- SAITO, K., YONEKURA-SAKAKIBARA, K., NAKABAYASHI, R., 2013. The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013, roč. 72, s. 21–34. ISSN 0981-9428.
- SHAFI, S.M., 2005. *Environmental Pollution*. New Delhi: Atlantic Publisher & Distributors. ISBN 9788126903665.

SIMONS, A. L., RENOUF, M., HENDRICH, S., MURPHY, P.A., 2005. Metabolism of glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) by human gut microflora. *undefined*. 2005.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 1999, roč. 299, s. 152–178. ISSN 0076-6879.

SOUDEK, P., PETROVÁ, Š., BENEŠOVÁ, D., KOTYZA, J., VANĚK, T., 2008. Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy*. 2008, roč. 102, č. 5, s. 346–352.

SOUZA, P.A. L., MARCADENTI, A., PORTAL, V.L., 2017. Effects of Olive Oil Phenolic Compounds on Inflammation in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease. *Nutrients*. 2017, roč. 9, č. 10. ISSN 2072-6643.

SPAGNUOLO, C., RUSSO, G.L., ORHAN, I.E., 2015. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*. 2015, roč. 6, č. 4, s. 408–19. ISSN 2156-5376.

SRINIVASAN, M., SUDHEER, A.R., MENON, V.P., 2007. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2007, roč. 40, č. 2, s. 92–100. ISSN 0912-0009.

STUHLÍKOVÁ, L., JIRÁSKO, R., SKÁLOVÁ, L., PAVLÍK, F., SZOTÁKOVÁ, B., HOLČAPEK, M., VANĚK, T., PODLIPNÁ, R., 2016. Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*). *Chemosphere*. 2016, roč. 157, s. 10–17. ISSN 18791298.

STUHLÍKOVÁ, L., SKÁLOVÁ, L., SZOTÁKOVÁ, B., SYSLOVÁ, E., VOKŘÁL, I., VANĚK, T., PODLIPNÁ, R., 2018. Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, roč. 147, č. June 2017, s. 681–687. ISSN 10902414.

SUN, M.Y., YE, Y., XIAO, L., 2016. Daidzein: A review of pharmacological effects. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2016, roč. 13, č. 3, s. 117. ISSN 0189-6016.

SUSARLA, S., MEDINA, V.F., 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*. 2002, roč. 18, č. 5, s. 647–658.

SVOBODA, J., 2005. *Organická chemie*. 1. vydanie. Praha: VŠCHT. ISBN 80-7080561-7.

SZOTÁKOVÁ, B., STUHLÍKOVÁ, L.R., SKÁLOVÁ, L., PODLIPNÁ, R., 2017. Phytotoxicity and Biotransformation of Fenbendazole in Ribwort.

- SZWAJGIER, D., BOROWIEC, K., PUSTELNIAK, K., 2017. The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action. *Nutrients*. 2017, roč. 9, č. 5. ISSN 2072-6643.
- SZYMCZAK, G., WÓJCIAK-KOSIOR, M., SOWA, I., 2017. Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017, roč. 57, s. 40–48. ISSN 0889-1575.
- THAMMANA, M., 2016. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, roč. 5, č. 2, s. 22–28.
- TRAGANOS, F., ARDELT, B., HALKO, N., 1992. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer research*. 1992, roč. 52, č. 22, s. 6200–8. ISSN 0008-5472.
- TURKINGTON, C., ASHBY, B., 2007. *The Encyclopedia of Infectious Diseases*. New York: Facts on File Inc. ISBN 9780816063970
- TZIN, V., GALILI, G., 2010. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Molecular Plant*. 2010, roč. 3, č. 6, s. 956–972. ISSN 16742052.
- URQUIAGA, I., LEIGHTON, F., 2000. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*. 2000, roč. 33, č. 2, s. 55–64. ISSN 0716-9760.
- VITALE, D. C., PIAZZA, C., MELILLI, B., 2013. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2013, roč. 38, č. 1, s. 15–25. ISSN 0378-7966.
- VOTAVA, M., 2006. *Lekářská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 8090289665.
- WONG, K.H., LI, G.Q., LI, M.K., 2011. Kudzu root: Traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, roč. 134, č. 3, s. 584–607. ISSN 0378-8741.
- YILDIZ, F., 2006. *Phytoestrogens in functional foods*. B.m.: CRC Press [cit. 12. február 2019]. ISBN 9781574445084.
- ZENKOV, N. K., CHECHUSHKOV, A.V., KOZHIN, P.M., 2016. Plant phenols and autophagy. *Biochemistry (Moscow)*. 2016, roč. 81, č. 4, s. 297–314. ISSN 0006-2979.
- ZHANG, B., SU, Y.P., BAI, Y., 2015. Inhibitory effects of O-methylated isoflavone glycitein on human breast cancer SKBR-3 cells. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015, roč. 8, č. 7, s. 7809–17. ISSN 1936-2625.

ZHANG, Y., WANG, G.Y., SONG, T.T, 1999. Urinary Disposition of the Soybean Isoflavones Daidzein, Genistein and Glycitein Differs among Humans with Moderate Fecal Isoflavone Degradation Activity. *The Journal of Nutrition*. 1999, roč. 129, č. 5, s. 957–962. ISSN 0022-3166.